

ARIANI CORRÊA BARBOSA

**EFEITOS DA CARPROPAMIDA E SACAROSE SOBRE A MELANIZAÇÃO E
MOBILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS EM *Colletotrichum acutatum***

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas, Departamento de Biologia Celular, da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
para obtenção do grau de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ruth Janice Guse
Schadeck

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Ruth Janice Schadeck, por suas idéias para esse trabalho, e pela dedicação e paciência com as quais contribuiu para o meu desenvolvimento.

À co-orientadora Lucélia Donatti, pela simpatia e valorosa ajuda na preparação do material para análise em microscopia eletrônica.

Ao professor Marco Randi, pela ajuda na parte de informática.

Em especial à minhas irmãs e aos meus pais Wilson e Terezinha, por acreditarem em mim, e por todo o apoio, desde o início, mesmo estando distantes.

Aos meus colegas e amigos pelas felizes conversas sobre o curso e a vida.

À professora Maria Angélica Haddad, que foi exemplo em uma etapa de minha formação acadêmica.

Ao meu querido Sandro, por estar perto nos momentos críticos da realização deste trabalho, pela compreensão e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE FILMES.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 GERMINAÇÃO EM FUNGOS.....	3
2.1.1 Características da germinação.....	3
2.1.2 Germinação e nutrientes.....	5
2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS VACÚOLOS.....	6
2.3 MELANINAS.....	7
2.3.1 Síntese e estrutura.....	7
2.3.2 Propriedades da Melanina.....	9
2.3.3 Melanina e patogenicidade.....	10
2.3.4 Inibidores da biosíntese de melanina.....	11
2.4 A MICROSCOPIA ELETRÔNICA E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE FUNGOS.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 CRESCIMENTO DO FUNGO.....	14
4.2 GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS.....	14
4.3 TRATAMENTO COM KTU.....	14
4.4 EFEITO DE AÇÚCARES SOBRE A GERMINAÇÃO.....	14
4.5 COLORAÇÃO DE LIPÍDEOS COM VERMELHO NILO.....	15
4.6 COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA.....	15
4.7 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA CONFOCAL.....	15
4.8 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	16
4.9 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	16
5. RESULTADOS.....	17

5.1	PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE KTU E FONTES DE CARBONO.....	17
5.2	EFEITOS DO KTU SOBRE A GERMINAÇÃO APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	18
5.3	EFEITOS DO KTU SOBRE A GERMINAÇÃO APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	19
5.4	VIABILIDADE DOS CONÍDIOS.....	19
5.5	EFEITOS DA ADIÇÃO DE SACAROSE SOBRE A GERMINAÇÃO.....	20
5.6	EFEITOS DA ADIÇÃO SIMULTANEA DE KTU E SACAROSE SOBRE A GERMINAÇÃO.....	20
5.7	EFEITOS DA SACAROSE SOBRE A VACUOLIZAÇÃO.....	20
5.8	EFEITOS DO KTU E SACAROSE SOBRE OS CONÍDIOS NÃO GERMINADOS.....	21
5.9	ESTUDO DA GERMINAÇÃO ATRAVÉS DE MICROFILMAGEM.....	21
5.10	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	22
5.11	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	23
	FIGURAS.....	24
	LEGENDAS DOS FILMES.....	36
6.	DISCUSSÃO.....	38
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA GERMINAÇÃO EM <i>C. acutatum</i>	38
6.2	EFEITOS DO KTU SOBRE A MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO EM MEMBRANAS DE CELOFANE.....	39
6.3	EFEITOS DA ADIÇÃO DE FONTE DE CARBONO SOBRE A MELANIZAÇÃO, MOBILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS E VACUOLIZAÇÃO.....	41
6.4	PADRONIZAÇÃO PARA MET E MEV.....	44
7.	CONCLUSÕES.....	46
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
	ANEXO.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – GERMINAÇÃO DO CONTROLE COM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	24
FIGURA 2 – INIBIÇÃO DA MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO COM KTU.....	25
FIGURA 3 – INIBIÇÃO DA MELANIZAÇÃO SEM PENETRAÇÃO E ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA DO APRESSÓRIO APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO COM KTU.....	26
FIGURA 4 – EFEITOS DO KTU SOBRE MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	27
FIGURA 5 – MATRIZ EXTRACELULAR NO TRATAMENTO COM KTU.....	28
FIGURA 6 – TESTE DE VIABILIDADE DO KTU ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA.....	29
FIGURA 7 – EFEITO DA SACAROSE SOBRE A MOBILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	30
FIGURA 8 – EFEITOS DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE KTU E SACAROSE SOBRE A GERMINAÇÃO.....	31
FIGURA 9 – EFEITOS DA SACAROSE SOBRE A VACUOLIZAÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO.....	32
FIGURA 10 – EFEITOS DO KTU E SACAROSE SOBRE OS CONÍDIOS NÃO GERMINADOS.....	33
FIGURA 11 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	34
FIGURA 12 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	35

LISTA DE FILMES

Os filmes estão no CD em anexo

FILME 1 – CONÍDIO COM TUBO GERMINATIVO E APRESSÓRIO
MELANIZADO

FILME 2 – ATIVIDADE DENTRO DA HIFA PRIMÁRIA

FILME 3 – MOVIMENTOS DE GRÂNULARES EM HIFA PRIMÁRIA

FILME 4 – MOVIMENTAÇÃO DE GRÂNULOS NOS VACÚOLOS E LIPÍDEOS NO
CONÍDIO SECUNDÁRIO

FILME 5 – VACÚOLO NO APRESSÓRIO PRIMÁRIO E LIPÍDEOS NO
APRESSÓRIO SECUNDÁRIO

FILME 6 – MOVIMENTAÇÃO DE VESÍCULAS NO VACÚOLO DO APRESSÓRIO
PRIMÁRIO

FILME 7 – MOVIMENTAÇÃO DOS CORPOS LIPÍDICOS COM KTU

FILME 8 – MOVIMENTAÇÃO DOS LIPÍDEOS COM SACAROSE E VN

FILME 9 – MOVIMENTAÇÃO DOS LIPÍDEOS COM SACAROSE EM DIC

FILME 10 – MOVIMENTAÇÃO DE VESÍCULAS NOS VACÚOLOS COM
SACAROSE

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA: Batata-dextrose-ágar

DIC: Contraste de Interferência Diferencial

DHN-melanina: Dihidroxi-naftaleno-melanina

THN: Tetra-hidroxi-naftaleno

DOPA-melanina: Dihidroxifenilalanina-melanina

LA: Laranja de Acridina

VN: Vermelho Nilo

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

RESUMO

Os fungos fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* apresentam corpos lipídicos e vacúolos no citoplasma e apressório melanizado. Tanto os lipídios quanto a melanina têm sido considerados fatores de patogenicidade. A melanização do apressório e a digestão dos triacilgliceróis dos lipídios armazenados são vitais para a germinação e infecção do hospedeiro. Neste trabalho conídios de *Colletotrichum acutatum* foram tratados com carpropamida (KTU comercial), fungicida que atua inibindo a síntese da melanina específica de fungos, DHN-melanina, com os objetivos principais de analisar a melanogênese, a mobilização de lipídeos e a penetração em membranas artificiais. Os conídios também foram incubados com sacarose visando estimular a melanização e o processo germinativo. Os conídios tratados nas diferentes condições foram submetidos à análise em microscopia confocal para detecção citoquímica de lipídeos e de compartimentos ácidos e microscopia por contraste de interferência. Foi realizada também a padronização do processamento em microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. As análises em microscopia de luz e confocal de conídios incubados com KTU pelo período de 24 horas revelaram a presença de apressórios não melanizados, demonstrando que nestas condições o composto está atuando conforme o descrito para outros fungos. Entretanto, apesar de não melanizados, os conídios eram capazes de realizar a penetração em membranas de celofane. Os conídios tratados exibiram concentração relativamente grande de lipídeos quando comparados ao controle. Após 72 horas de incubação com KTU não se observou inibição da melanização. Ao contrário, os apressórios estavam melanizados e apresentavam penetração em membranas de celofane, fato inesperado e que vai de encontro à sua aplicação nas lavouras. Ensaio de conídios incubados com sacarose 0,1% revelaram efeito estimulante sobre a germinação, com a formação de apressórios melanizados e acúmulo de grandes corpos lipídicos quando comparados ao controle, no qual os lipídeos eram geralmente consumidos ou apareciam menores. Além disso, a adição daqueles dissacarídeos pareceu promover a vacuolização nos conídios. Estudos futuros são necessários para confirmar a relação entre vacúolos e nutrientes externos. O processamento para microscopia eletrônica foi adequado a preservação das estruturas celulares, inclusive dos corpos lipídicos. Entretanto, não revelou uma camada definida de melanina, conforme a expectativa. Novas análises serão realizadas para esclarecer este fato. Pelo acima exposto, as informações geradas neste trabalho abrem novas perspectivas de investigação em aspectos cruciais da patogênese em fungos. O conhecimento dos mecanismos pelos quais os fungos germinam e infectam seu hospedeiro podem servir de base para a elaboração de estratégias de controle desses patógenos.

Palavras-chave: Germinação, carpropamida, melanização, lipídeos, sacarose.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* é um grupo extremamente comum de fungos fitopatógenos causador de antracnose em plantios do mundo todo (FREEMAN et al., 2000), incluindo gramíneas, árvores frutíferas e cereais. Esta é uma doença muito destrutiva, sendo, na maioria dos casos, de difícil controle (KIMATI et al., 1997). *Colletotrichum acutatum* é a principal espécie causadora da antracnose do morango, doença que provoca grandes prejuízos econômicos. Esta espécie revela-se um bom modelo para o estudo do gênero pela facilidade de conidiogênese e germinação em condições de laboratório.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* pertencem ao filo ou divisão Ascomycota e ordem Phyllachorales (ALEXOPOULOS et al., 1996). Fungos da divisão Ascomycota produzem tanto esporos sexuais, os chamados ascósporos, quanto esporos assexuais, os conídios (OSHEROV e MAY, 2001). Desse modo, são chamados de conídios os esporos formados assexuadamente nos lados ou extremidades de uma hifa (ALEXOPOULOS et al., 1996). Em espécies de *Colletotrichum* os conídios estão envoltos por uma matriz extracelular solúvel em água e composta de glicoproteínas (SELA-BUURLAGE et al., 1991). Uma secreção adicional de matriz extracelular, que depende da síntese protéica, acontece durante a germinação (BRAUN e HOWARD, 1994).

A presença de corpos lipídicos e vacúolos no citoplasma é característica comum a conídios de diferentes espécies de *Colletotrichum* (MIMS et al., 1995; SCHADECK et al., 1998a; 2005). A digestão intracelular dos triacilgliceróis dos corpos lipídicos armazenados é vital para o processo germinativo (THINES et al., 2000). Ela produz o glicerol, o qual ao acumular-se no apressório, juntamente com a melanina, é responsável pela pressão de turgor necessária para o processo de penetração (THINES et al., 2000). Portanto, tanto a melanina fúngica quanto os lipídeos armazenados pelo conídio, tem sido encarados como fatores de virulência em fungos fitopatógenos.

A interferência em um mecanismo pelo qual o fungo infecta o seu hospedeiro é uma estratégia de controle mais interessante do que a intervenção em processos biológicos comuns a todos os organismos superiores, pois ocasiona menos efeitos para a planta hospedeira (JENNINGS et al., 2000). Pelo fato de

patógenos como *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum lagenarium* e *Colletotrichum lindemuthianum* precisam melanizar o apressório para penetrar na superfície foliar (LANGFELDER et al., 2003; MONEY e HOWARD, 1996), as enzimas da via de biosíntese da melanina são ótimos alvos para o desenvolvimento de fungicidas.

As exigências nutricionais para a germinação são muito variadas entre os fungos. Alguns necessitam obrigatoriamente a adição de nutrientes (CARLILE e WATKINSON, 1994), enquanto outros germinam somente em presença de água, como *Colletotrichum graminicola*, consumindo os lipídios armazenados (SCHADECK et al., 1998a; LEITE e NICHOLSON, 1992). Estudos anteriores revelaram que *C. acutatum* também germina em presença apenas de água. Por outro lado, a adição de meio complexo à germinação de *C. acutatum* induz um rápido crescimento micelial (BARBOSA, Relatório de Iniciação Científica, 2004). Uma vez que a melanização e a mobilização de lipídeos são processos essenciais para a germinação, é possível que variações nutricionais no meio afetem estes dois aspectos.

A compreensão dos mecanismos celulares, em especial dos processos envolvidos na melanização e mobilização de reservas endógenas, tem importantes implicações práticas, podendo auxiliar na elaboração de estratégias de controle da antracnose, a qual causa grande prejuízo para a agricultura. Este trabalho teve como alvos principais avaliar os efeitos da carpropamida, fungicida utilizado no controle da ferrugem do arroz, sobre a síntese de melanina e mobilização dos corpos lipídicos durante a germinação de *C. acutatum*, e investigar os efeitos da adição de sacarose sobre as características gerais da germinação e da mobilização lipídeos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GERMINAÇÃO EM FUNGOS

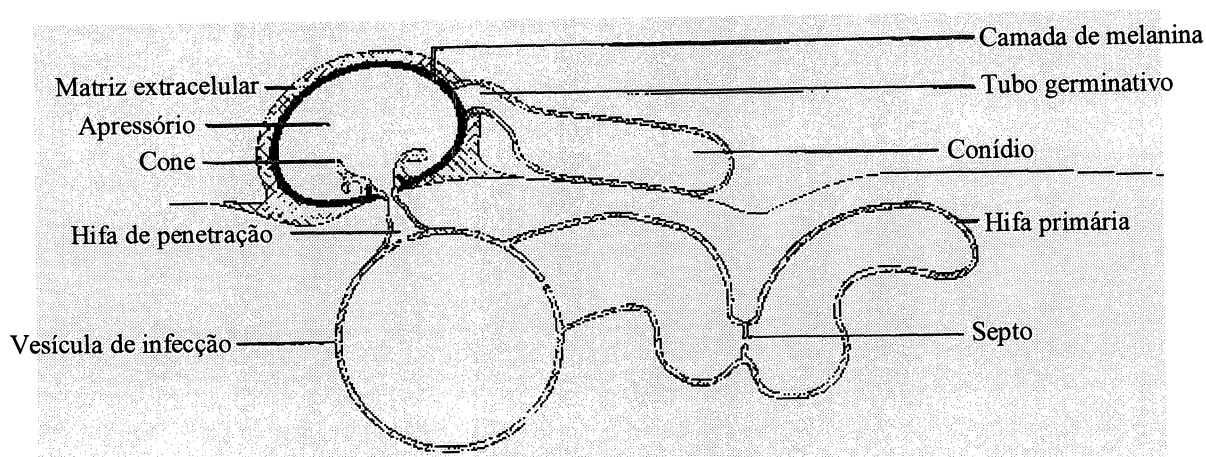
2.1.1 Características da germinação

No meio ambiente, a infecção pelo fungo tem início no contato do hospedeiro com os conídios trazidos pelo ar ou pela água, os quais começam o processo infeccioso através da germinação (OSHEROV e MAY, 2001). A germinação envolve uma série de mudanças morfológicas, incluindo a formação de estruturas especializadas, tais como tubo germinativo e apressório em alguns fungos, formadas a partir de uma única célula, o conídio (SCHADECK et al., 1998a). As transformações citológicas são dependentes da concomitante ativação do metabolismo. Observa-se grande aumento dos processos de síntese e consumo de energia (GRIFFIN, 1994), incluindo respiração, síntese de RNA e proteínas, além de diferenças na composição da parede celular (SCHMIT e BRODY, 1976).

Os mecanismos de germinação do conídio são tão diversos e variados quanto o número de espécies que produzem conídios (OSHEROV e MAY, 2001). Contudo, segundo esses autores, alguns eventos ocorrem na maioria dos casos: quando supridos com os nutrientes apropriados, na presença de água e ar, os conídios aumentam (hidratam) rapidamente e passam por uma mudança nas propriedades de superfície, como evidenciado pelo aumento da adesão ao substrato. Após a hidratação e adesão acontece o crescimento do tubo germinativo (OSHEROV e MAY, 2001). Uma abundante matriz extracelular envolve o tubo germinativo, possivelmente ajudando na sua adesão à superfície hospedeira (VAN DYKE e MIMS, 1991). Em muitos gêneros de fungos fitopatógenos, como *Magnaporthe*, *Colletotrichum* e *Ustilago*, a extremidade da hifa ou tubo germinativo dilata para formar o apressório.

Os apressórios de fungos do gênero *Colletotrichum* constituem células de infecção complexas (MENDGEN e DEISING, 1993; MENDGEN et al., 1996) e melanizadas. Na base do apressório existe um poro, de onde se projeta a chamada hifa de infecção ou penetração, a qual penetra no tecido hospedeiro, seguida pela formação da vesícula de infecção e da hifa primária (KIM et al., 2000; THINES et

al., 2000). Abaixo, vemos um esquema das estruturas de infecção feito a partir de *C. lindemuthianum* sobre folhas de feijão.



Adaptado de MENDGEN e DEISING (1993).

A adesão do apressório à superfície hospedeira parece ser mediada por uma matriz extracelular, a qual foi observada em *Colletotrichum truncatum* através de microscopia eletrônica (VAN DYKE e MIMS, 1991). SUGUI et al. (1998) demonstrou a presença de uma glicoproteína de alto peso molecular rica em manose na matriz extracelular de *Colletotrichum graminicola*. Da mesma forma, os conídios do gênero *Colletotrichum* são envolvidos por um material mucilaginoso, cuja função geral seria a proteção dos esporos contra dessecação e produtos tóxicos gerados no decorrer do desenvolvimento de lesões (NICHOLSON et al., 1989). Uma substância encontrada na mucilagem é a micosporina-alanina, a qual tem sido referida como auto-inibidora de germinação, inibindo a formação de apressórios em conídios jovens e estimulando a germinação em conídios velhos (LEITE e NICHOLSON, 1992). SCHADECK (1999) observou que a mucilagem do conídio não germinado e a matriz extracelular do apressório possuem comportamentos diferentes quando sujeitas à um mesmo tratamento químico, sendo a matriz extracelular do apressório preservada e a mucilagem do conídio não. A autora sugere que se tratam de estruturas com composições químicas diferentes ou diferente associação com a parede celular.

Após a germinação e antes do crescimento micelial, algumas espécies de *Colletotrichum* podem formar um ou mais conídios, os chamados conídios secundários (LEANDRO et al., 2001). Segundo o mesmo autor, a formação de

conídios secundários em *C. acutatum* está relacionada com inibidores de germinação e desempenha um importante papel para a sobrevivência e multiplicação do fungo. Em fungos entomopatogênicos, o surgimento dos conídios secundários está associado a condições que inibem o desenvolvimento da hifa e a infecção (DARA e SEMTNER, 1998).

2.1.2 Germinação e nutrientes

Na maioria dos fungos filamentosos a germinação do conídio requer a presença de nutrientes de baixo peso molecular, como açúcares, aminoácidos e sais inorgânicos (CARLILE e WATKINSON, 1994). Em *Neurospora crassa* a germinação ocorre em presença apenas de sal e de uma fonte de carbono (SCHMIT e BRODY, 1976), enquanto que em *Aspergillus nidulans*, a presença apenas de glicose já é suficiente para induzir a germinação (OSHEROV e MAY, 2000).

Está demonstrado que a germinação de espécies de *Colletotrichum* pode acontecer na presença de água apenas (LEITE e NICHOLSON, 1992). Dessa forma, o conídio deve armazenar em seu citoplasma todas as reservas nutritivas, as quais deverão ser metabolizadas e disponibilizadas para atender à pesada demanda metabólica da germinação. Estudos em microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que conídios de espécies de *Colletotrichum* contêm elevado teor de gotículas de lipídeos (KERRIGAN e MIMS, 1993; MIMS et al., 1995). Os lipídeos funcionam, portanto, como reserva nutritiva, a qual é mobilizada durante a germinação.

A digestão intracelular dos triacilgliceróis dos corpos lipídicos armazenados disponibiliza os ácidos graxos, utilizados nos processos bioquímicos de transformação de energia e na formação de substratos para atividades de síntese (RUCH et al., 1991), e produz o glicerol. Este se acumula no apressório e é responsável pela pressão de turgor necessária para o processo de penetração, conforme demonstrado em *M. grisea* (THINES et al., 2000). Está estabelecido na literatura que para que a pressão de turgor aconteça, é necessário que o apressório esteja melanizado (LANGFELDER et al., 2003). Acredita-se que a melanina diminui a permeabilidade do apressório e aumenta a resistência

mecânica, facilitando a acumulação das moléculas geradoras da pressão de turgor dentro do mesmo, como o glicerol (THINES et al., 2000).

Evidências experimentais sugerem que a mobilização dos lipídeos envolve autofagia, por serem internalizados em vacúolos (WILSON et al., 1980; SCHADECK et al., 1998a; THINES et al., 2000). Em conídios não germinados, está demonstrado que os vacúolos participam da digestão intracelular dos lipídeos através de um processo microautofágico (SCHADECK et al., 1998a; SCHADECK et al., 2003). A autofagia revela-se aumentada nos processos de diferenciação e remodelagem celular (KLIONSKY e EMR, 2000) e em condições de meio deficiente de nutrientes (SATTLER e MEYER, 2000).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS VACÚOLOS

Os vacúolos estão presentes em diferentes estruturas fúngicas, como conídio e apressório, e podem exercer várias funções, entre elas: lisosomal, de armazenamento de substâncias, controle da homeostase, do pH e da concentração de íons no citosol (KLIONSKY et al., 1990). São organelas ácidas e a H⁺ATPase da membrana vacuolar está identificada e purificada em *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces calrsbergensis* (KLIONSKY et al., 1990). Segundo este autor, os vacúolos desempenham importante papel na degradação de componentes macromoleculares de levedura e outras células fúngicas.

A digestão intravacuolar é realizada por uma variedade de enzimas hidrolíticas (KLIONSKY et al., 1990), sendo a fosfatase ácida uma delas. Função lisosomal tem sido atribuída a vacúolos de vários fungos que apresentam esta enzima. A mesma está demonstrada em vacúolos de *Aspergillus flavus* (BOJOVIC-CVETIC e VUJICIC, 1982), em basidiósporos dormentes de *Psilocybe cubensis* (RUCH e MOTTA, 1987), em hifas de *Gigaspora margarita* (SAITO, 1995) e em *C. graminicola* (SCHADECK et al., 2003). No apressório deste fungo, o produto de reação da fosfatase ácida também está presente em vesículas de secreção e matriz extracelular (SCHADECK, 1999). Numerosos vacúolos marcados pela reação para fosfatase ácida foram observados em hifas de *Sclerotium rolfsii* (HÄNSSLER et al., 1975). Os autores consideram estes vacúolos como parte do sistema lisosomal do fungo, também sugerindo que a função primordial destes

compartimentos está relacionada com processos catabólicos e mobilização de reservas nutritivas.

Resultados obtidos em nosso laboratório com *C. acutatum* demonstraram que os vacúolos formados durante a germinação apresentam fosfatase ácida e são compartimentos com pH ácido, constituindo, portanto, parte do sistema lisosomal (digestivo) do fungo (BARBOSA et al., 2004). Além disso, a medida que a germinação progride, os vacúolos aumentam de tamanho, as vesículas no apressório tornam-se maiores, e ambos ficam mais intensamente marcados pela reação para fosfatase ácida, indicando aumento de atividade dessa enzima.

2.3 MELANINAS

2.3.1 Síntese e estrutura

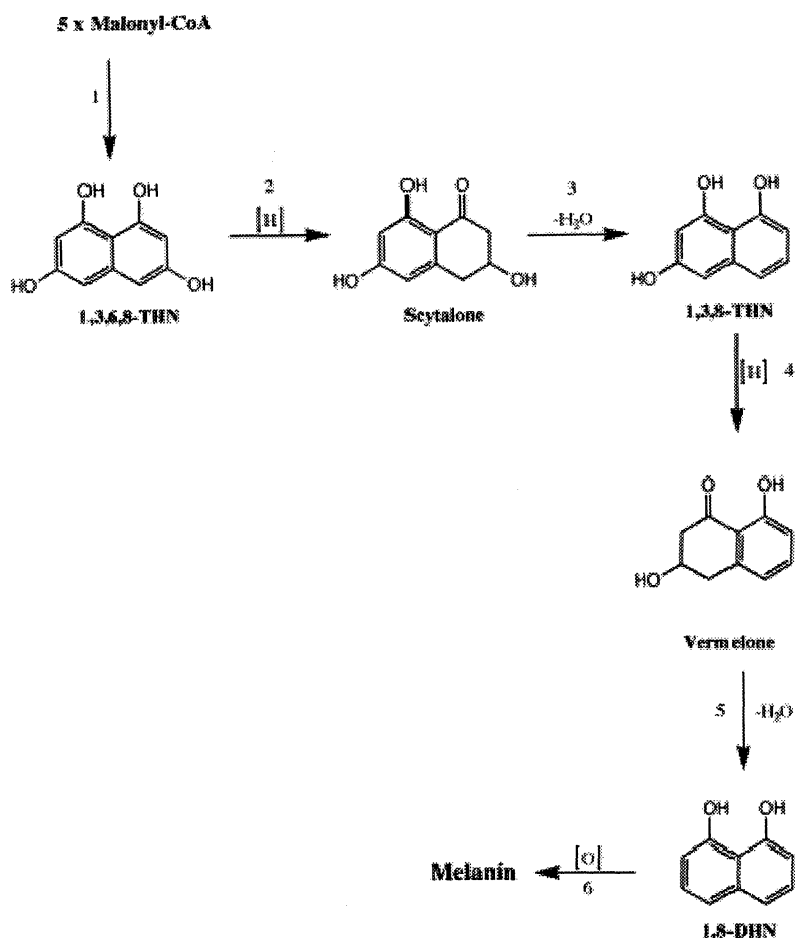
Melaninas são pigmentos de alto peso molecular, formadas por polimerização oxidativa de componentes fenólicos e indólicos, e geralmente apresentam coloração marrom escuro ou preto (JACOBSON, 2000). A origem do nome, do grego *melanos*, significa “escuro” (RILEY, 1997). O que define a unidade estrutural básica das melaninas é geralmente a presença de compostos indólicos ligados covalentemente (RILEY, 1997).

As melaninas fúngicas localizam-se incorporadas às paredes celulares de esporos e hifas, onde fazem parte de uma camada distinta eletrondensa ao microscópio (GRIFFIN, 1994).

Em fungos, as melaninas predominantes são as derivadas das moléculas precursoras de dihidroxinaftaleno (DHN-melaninas) e de dihidroxifenilalanina (DOPA-melanina). No gênero *Colletotrichum* foi identificada apenas DHN-melanina (KUBO e FURUSAWA, 1991).

A DHN-melanina é produzida através da chamada via biossintética policetídea, a qual tem sido amplamente estudada em *Wangiella dermatitidis* (JACOBSON, 2000). Os policetídeos são metabólicos secundários derivados da condensação de unidades de esqueletos carbono de forma similar a biossíntese de ácidos graxos (VARGA et al., 2003). Entre os inúmeros passos que ocorrem nessa via de formação da melanina, destacam-se a síntese de 1,3,6,8-tetra-hidroxi-

naftaleno (THN) (KIM et al., 1998), e sua subsequente conversão em scitalona, vermelona e 1,8-DHN (JACOBSON, 2000). A seguir vemos um esquema da via de biosíntese de DHN-melanina.



Biosíntese de DHN melanina (Adaptado de LANGFELDER et al., 2003).

Em vertebrados, as reações de síntese de melanina ocorrem em células melanogênicas especializadas, como os melanócitos, e em organelas próprias, os melanosomas (WINDER et al., 1994). Por outro lado, em fungos patógenos de humanos, a literatura tem descrito que a melanização acontece fora da membrana plasmática (WHEELER e BELL, 1988), na parede celular do fungo. Uma indicação da localização da melanina na parede celular de fungos é o fato de células melanizadas de *W. dermatitidis* serem mais resistentes à hidrólise enzimática do que as mesmas células tratadas com inibidor da síntese de melanina ou mutantes com bloqueios na síntese da mesma (DIXON et al., 1991). Contrariamente,

FRANZEN et al. (1999) demonstrou que a melanina encontrada na parede celular de *Fonsecaea pedrosoi*, patógeno humano, é sintetizada em vesículas citoplasmáticas acídicas, as quais têm sido designadas como estruturas semelhantes à melanosomas. Esta denominação tem sido recentemente aceita na literatura.

2.3.2 Propriedades da Melanina

As melaninas estão entre as mais estáveis, insolúveis e resistentes substâncias bioquímicas, e apresentam ampla distribuição no mundo vivo (RILEY, 1997; JACOBSON, 2000). Uma das propriedades dos polímeros de melanina, o amplo espectro de absorbância, deve-se alto grau de conjugação na molécula. Assim, a cor escura desse pigmento é devido ao fato de muito do espectro visível ser absorvido (RILEY, 1997).

Inúmeras funções são atribuídas às melaninas fúngicas. Além da influência no armazenamento de água e íons citado anteriormente, destacam-se a proteção contra lise do microrganismo, irradiação solar, luz ultravioleta e morte por radicais livres (FRANZEN et al., 1999). Segundo JACOBSON (2000), variedades melanizadas de fungos são mais resistentes à irradiação UV que variedades não melanizadas. Devido a resistência à radiação UV, esporos melanizados, de qualquer espécie, parecem ser mais infecciosos quando submetidos a luz do sol (JACOBSON, 2000). Além disso, a melanização de fungos tem proporcionado resistência ao calor em alguns casos (REHNSTROM e FREE, 1997), o que pode estar relacionado à captura, pela melanina, de radicais livres tóxicos que são produzidos na membrana celular como resultado do calor (JACOBSON, 2000).

As melaninas podem participar de reações redox de um e dois elétrons, sendo um dos efeitos da absorção de luz a foto-oxidação do pigmento. Este muda as propriedades de absorção da melanina (aumentando o conteúdo de carbonil), promovendo a reação de escurecimento imediato do pigmento (RILEY, 1997). Segundo JACOBSON (2000), a melanina é capaz de oxidar ou reduzir metais, podendo ligar-se a vários metais de transição. Essa propriedade pode ser útil para diminuir a concentração de metais livres, no caso de metais tóxicos, e para criar

uma espécie de reservatório para a célula, no caso de metais essenciais (JACOBSON, 2000).

WANG e CASADEVALL (1994) defendem o papel da melanina na virulência em *Cryptococcus neoformans*, fungo comum em humanos e animais. Em experimentos com radicais livres de oxigênio e nitrogênio, as células melanizadas sobreviveram cerca de dez vezes mais que as células não melanizadas. Isso indica a importância da melanina na proteção do patógeno contra os radicais livres produzidos pelo hospedeiro (WANG e CASADEVALL 1994), ou seja, no mecanismo patogênico.

2.3.3 Melanina e patogenicidade

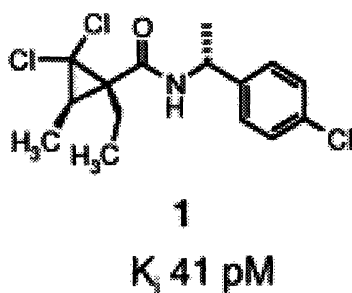
Embora nem todos os fungos patogênicos produzam melanina, existe um grande número de fungos potencialmente invasivos os quais têm em comum o fato de produzirem esse pigmento (JACOBSON, 2000). Entre os fungos que causam doenças em plantas, está bem estabelecido na literatura que em *M. grisea* e em várias espécies de *Colletotrichum* a síntese de melanina é essencial para a virulência (MONEY e HOWARD, 1996).

Como citado anteriormente, a melanina torna o apressório menos permeável e aumenta a resistência mecânica, o que facilita o acúmulo de moléculas geradoras de pressão de turgor dentro do mesmo, como o glicerol oriundo da hidrólise dos triacilgliceróis dos corpos lipídicos (THINES et al., 2000). Sem este turgor, a hifa de penetração não consegue transpor a superfície artificial ou hospedeira, não sendo capaz, então, de promover a infecção (WANG et al., 1995).

Experimentos com inibidores de síntese de melanina têm demonstrado que o apressório não melanizado não é capaz de penetrar a superfície da planta hospedeira ou de um substrato sintético, o mesmo ocorrendo para mutantes com deficiência de melanina (SUZUKI et al., 1982; HOWARD e FERRARI, 1989; CHUMLEY e VALENT, 1990). Mutantes de *M. grisea* e *C. lagenarium*, os quais formam apressório hialino, não puderam penetrar na superfície epidérmica ou na de barreiras, como o celofane, mas esse processo foi parcialmente restabelecido com a adição de precursores de melanina, tais como scitalona, vermelona ou 1,8-DHN, aos mutantes (KIM et al., 1998).

2.3.4 Inibidores da biosíntese de melanina

As enzimas envolvidas na via biosintética da melanina tem sido o principal alvo para o desenvolvimento de fungicidas (KIM et al., 1998). Segundo o mesmo autor, entre substâncias que interferem na biosíntese de melanina em fungos estão o triciclazol e a carpropamida. A fórmula estrutural da carpropamida é mostrada abaixo.



Fonte: JENNINGS et al. (2000).

A carpropamida foi recentemente comercializada pela Bayer como um fungicida útil para o controle da ferrugem do arroz (JENNINGS et al., 2000) causada por *M. grisea* e é comercialmente chamada de KTU. Ela constitui um potente inibidor da atividade catalítica da scitalona desidratase, enzima que catalisa a desidratação de scitalona e vermelona, precursores da melanina (JENNINGS et al., 2000). Dessa forma, a carpropamida inibe a biosíntese de melanina bloqueando os passos de desidratação entre scitalona e 1,3,8-THN e entre vermelona e 1,8-DHN (KURAHASHI et al., 1997).

Assim, inibindo uma das enzimas da via de biosíntese da melanina, a carpropamida impediria a melanização do apressório, o que, conforme descrito na literatura, afeta a patogenicidade do fungo. Segundo TSUJI et al. (1997), a carpropamida impediu a melanização do apressório e penetração em *C. lagenarium*. Contudo, no campo, a carpropamida não se mostra eficiente para antracnose do morango causada por *C. acutatum*, conforme protocolos padrões de aplicação de fungicidas nas lavouras. Entre as características da carpropamida destacam-se a alta seletividade pelo patógeno alvo e a baixa toxicidade para mamíferos e peixes (JENNINGS et al., 2000).

2.4 A MICROSCOPIA ELETRÔNICA E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE FUNGOS

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) são ferramentas que tem sido largamente empregadas em estudos de melanização e outras características da biologia celular de fungos. Normalmente observa-se uma camada elétron densa de melanina depositada na parede celular (O'CONNELL et al., 1985; VAN DYKE e MIMS, 1991; SCHADECK et al., 1998a) a qual desaparece com tratamentos com inibidores de melanina (O'CONNELL et al., 1985; VAN DYKE e MIMS, 1991). Na maioria das vezes estes estudos são realizados com crio-fixação, que tem demonstrado melhores resultados na preservação da maior parte das estruturas intracelulares dos fungos. A fixação química convencional tem sido preterida, pois produz menor preservação dos detalhes ultraestruturais (MIMS, 1991). Entretanto, a crio-fixação remove totalmente os lipídeos do citoplasma. Portanto, não se emprega para estudo de corpos lipídicos. Logo, é importante que se padronize uma metodologia de processamento para MET que permita a observação destas organelas a nível ultraestrutural. Além disso, especialmente em estudos que objetivam analisar a morfologia de superfície, a MEV também tem sido vastamente utilizada no estudo de fitopatógenos. Neste trabalho pretendemos padronizar metodologias em MEV e MET que permitam observar alterações no volume e forma do apressório e outras estruturas de infecção.

3. OBJETIVOS

Geral

- Contribuir para o conhecimento sobre os processos envolvidos na melanização e mobilização de reservas lipídicas em fungos do gênero *Colletotrichum*

Específicos

- Identificar os efeitos da carpropamida sobre a síntese de melanina, morfologia do apressório e mobilização dos corpos lipídicos durante a germinação de *C. acutatum*;
- Avaliar os efeitos da carpropamida sobre a penetração de *C. acutatum* em membranas de celofane;
- Determinar os efeitos da adição de carboidratos sobre as características gerais da germinação e mobilização de lipídeos em *C. acutatum*;
- Padronizar as condições ótimas do processamento para microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CRESCIMENTO DO FUNGO

O fungo *C. acutatum* foi isolado pela Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná - Departamento de Fiscalização, Divisão do Centro de Diagnóstico Marcos Enriette a partir de frutos doentes do Paraná. O fungo foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) na temperatura de 26°C, sob condições de iluminação fluorescente, com fotoperíodo de 12 horas.

4.2 GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS

Com o propósito de obtenção de apressórios durante a germinação, os conídios foram cultivados durante 5-7 dias em meio BDA, sendo, em seguida, coletados e colocados em água destilada e esterilizada. A suspensão ($1,5 \times 10^4$ conídios/mL) foi colocada em cubas, contendo membranas de celofane (18 x 18mm), as quais foram levadas à estufa com as mesmas condições de cultivo.

4.3 TRATAMENTO COM KTU

Os conídios foram incubados nas condições descritas no item 4.2, em presença de KTU comercial (Bayer, 3616 SC 300) nas seguintes concentrações: 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,8 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 25 µg/mL; 40 µg/mL.

4.4 EFEITO DE AÇÚCARES SOBRE A GERMINAÇÃO

Os conídios foram incubados conforme as condições descritas no item 4.2, em presença de sacarose e dextrose 0,1%.

4.5 COLORAÇÃO DE LIPÍDEOS COM VERMELHO NILO

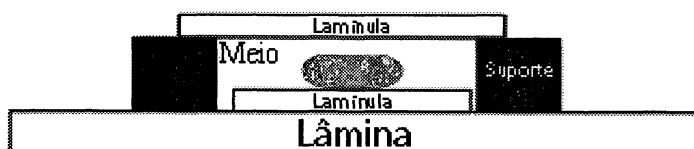
Para estudo dos corpos lipídicos, os conídios tratados foram corados por 5 min em solução contendo Vermelho Nilo (Sigma) 2,5 µg/mL (THINES et al., 2000) e observadas em microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado à Eclipse E-800 (Nikon®). Foi utilizada objetiva com lente de imersão plana-apocromática 60X/1.4 NA e microscopia de interferência diferencial por contraste (DIC) conforme trabalho de FRANZEN et al. (1999). O Vermelho Nilo foi excitado utilizando-se o laser verde HeNe de 543µm e a imagem obtida através do filtro de emissão E600LP.

4.6 COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA

Para identificação dos vacúolos, através de seu pH ácido, as preparações foram incubadas por 30 minutos na presença de solução aquosa de laranja de acridina (Sigma) 15µg/mL e examinadas em microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado à Eclipse E-800 (Nikon®). Foi utilizada objetiva com lente de imersão plana-apocromática 60X/1.4 NA e microscopia de interferência diferencial por contraste (DIC) conforme trabalho de FRANZEN et al. (1999). Comprimento de onda de excitação: 488 µm, laser de Argônio; Aquisição: dois PMTs, usando 600/50 BLD e filtro de emissão HQ 530/60.

4.7 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA CONFOCAL

Para evitar o surgimento de artefatos que poderiam ser provocados pela pressão da lamínula sobre os conídios, procedeu-se a montagem da lâmina com uso de suportes laterais, como mostrado no esquema abaixo. Um fragmento de fita adesiva foi colocado em cada lado da lâmina, de modo que a lamínula pudesse ser colocada entre eles.



4.8 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Conídios não germinados e germinados sobre membrana celofane foram fixados na mistura de Karnovski (tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2; glutaraldeído 2,0%; p-formaldeído 4,0%), pelo período de duas horas. A seguir foram lavados três vezes no mesmo tampão, fixados em tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 pelo período de 1 hora. Na seqüência, foram lavados uma vez em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, duas vezes em água destilada, e então mantidos em uranila aquosa 2% por 2 horas. Após isto, foram desidratados em série crescente de concentrações de soluções aquosas de etanol e acetona, infiltrados e emblocados em Epon 812 (LUFT, 1961) e submetidos à ultramicrotomia. Os cortes foram posteriormente contrastados com acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EXII do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

4.9 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Conídios germinados sobre membrana celofane foram fixados na mistura de Karnovski (tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2; glutaraldeído 2,0%; p-formaldeído 4,0%; CaCl_2 5,0 mM), pelo período de duas horas. A seguir foram lavados três vezes no mesmo tampão, fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato pelo período de 1 hora. Em seguida, foram lavados três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após isto, foram desidratados em série crescente de concentrações de soluções aquosas de etanol, submetidos ao ponto crítico e observados ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6360 LV Scanning Electron Microscope) em baixo vácuo.

5. RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE KTU E FONTES DE CARBONO

Várias concentrações de KTU foram testadas com 24 horas de germinação. A menor concentração que produziu os melhores resultados sobre a inibição da melanização com manutenção das características gerais da germinação semelhantes ao controle foi 40 µg/mL. Como fontes de carbono foram testadas a dextrose e a sacarose. A concentração de sacarose e dextrose que produziu o máximo de germinação e melanização, sem a formação de micélio ou muita variação morfológica, foi a concentração de 0,1%. Os resultados obtidos com essas duas fontes de carbono foram praticamente os mesmos. Optou-se então pelo emprego da sacarose.

Foram realizadas quatro condições de germinação:

- a) controle - germinação somente em água, sem adição de sacarose ou KTU;
- b) tratamento somente com KTU - germinação em água, sem adição de sacarose, mas com adição de KTU;
- c) tratamento somente com sacarose - germinação em água, com adição de sacarose.
- d) tratamento com KTU e sacarose - germinação em água com adição simultânea de sacarose e KTU.

	KTU 40 µg/mL	Sacarose 0,1%
Controle	-----	-----
Tratamento com KTU	+	-----
Tratamento com Sacarose	-----	+
Tratamento com KTU+Sacarose	+	+

Tabela: Condições analisadas

5.2 EFEITOS DO KTU SOBRE A GERMINAÇÃO APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO

Após 24 horas de incubação em membrana de celofane, tubos germinativos e apressórios já estavam formados tanto no controle (fig. 1A) quanto no tratamento com KTU (fig. 2A). O mesmo conídio pode apresentar mais de um tubo germinativo e apressórios em diferentes graus de melanização, como se pode observar na figura 1A. O controle apresentou apressórios melanizados (fig. 1A) enquanto o tratamento com KTU inibiu a melanização (fig. 2A). Sem a presença de melanina na parede celular o conteúdo citoplasmático, como os corpos lipídicos, fica perfeitamente visível no apressório (figs. 2A-B). Neste período de incubação, vários apressórios do controle (fig. 1A) e do tratamento com KTU (fig. 2C) apresentavam a hifa primária. Estes resultados demonstram que no caso de *C. acutatum* a melanização não é pré-requisito para a penetração em membranas artificiais.

Algumas dificuldades na identificação de todas as estruturas de germinação e penetração foram encontradas. Considerando o grau de resolução do microscópio, o tamanho das estruturas de infecção e as condições de orientação da penetração, na maior parte dos casos não foi possível distinguir outras estruturas de infecção além da hifa primária, a qual foi identificada com base na presença do septo. As hifas primárias, arranjadas paralelas ao plano do celofane foram facilmente discernidas, bastando para isso mudar o plano de foco. Assim, quando o apressório era focalizado, a hifa no interior do celofane ficava fora de foco aparecendo como uma sombra (figs. 1A e 2A) e vice e versa (figs. 1A e 2C). Estruturas perpendiculares foram muito difíceis de serem visualizadas na sua unidade. Entretanto, o poro na base do apressório (a partir do qual projeta-se a hifa de penetração) foi observado em apressórios não melanizados (figs. 1D-E).

O conídio não germinado estava repleto de corpos lipídicos (figs. 10 A-B e 11G) os quais diminuíram muito, em alguns casos quase completamente, após a germinação (fig. 1B) do controle. As estruturas de infecção mostraram poucos depósitos lipídicos, como observado no apressório melanizado, na hifa primária e nos tubos germinativos (fig. 1B). Contrariamente ao observado no controle, os conídios tratados com KTU apresentaram grandes corpos lipídicos, mesmo após a formação completa das estruturas de infecção. Embora o conídio germinado (figs.

2B e 3D) possuísse menor número de corpos lipídicos quando comparado com o conídio não germinado controle (fig. 10B), ele apresentou um conteúdo visualmente maior que o conídio germinado controle, incubado somente em presença de água (figs. 1B e 3B). Mesmo no interior da hifa primária, foram observados grandes corpos lipídicos (fig. 2D), o que não se verificou no controle (fig. 1B). Além dos efeitos sobre a melanização e mobilização de lipídeos, o KTU agiu sobre o formato dos apressórios, tendo ocorrido um grande número de apressórios com forma anormal (fig. 3C).

Outra característica observada foi a presença de uma evidente matriz extracelular em torno dos apressórios de incubações com KTU (figs. 5A, B, C), fato que não foi comum no controle.

5.3 EFEITOS DO KTU SOBRE A GERMINAÇÃO APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO

Após 72 horas de incubação na presença de KTU, pudemos verificar que alguns conídios germinados já possuíam apressórios inicialmente melanizados (fig. 4A), bem como hifas primárias invadindo a membrana de celofane (figs. 4B e D). Neste período ocorreu o acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma (fig. 4A e C) e hifa primária (fig. 4D). Em alguns apressórios, pelo fato de estarem no início da melanização, também foi possível visualizar o acúmulo de lipídeos (fig. 4C). Portanto, neste período, o KTU não inibiu a melanização do apressório, e a penetração no celofane ocorreu da mesma maneira que nos apressórios não melanizados. O padrão do controle foi igual ao obtido com 24 horas de incubação. Ou seja, conídios germinados com apressório melanizado (figs. 1 A, 3A) e poucos lipídeos residuais (figs. 1B, 3B).

5.4 VIABILIDADE DOS CONÍDIOS

A fim de verificar a viabilidade dos conídios, estes foram incubados com laranja de acridina, um corante vital que acumula-se em compartimentos ácidos. Os resultados de microscopia confocal que mostram a captação de laranja de

acridina pelos vacúolos de conídios tratados com KTU indicam que este composto não matou o fungo (fig. 6).

5.5 EFEITOS DA ADIÇÃO DE SACAROSE SOBRE A GERMINAÇÃO

Os conídios incubados com sacarose apresentaram germinação maior que o controle (conídios incubados em presença apenas de água). Apressórios melanizados foram encontrados com grande frequência (figs. 7C e 8C). Verificou-se também diminuição do conteúdo lipídico do conídio germinado, entretanto, os corpos lipídicos residuais eram muito maiores (figs. 7D e 8D) que na germinação em água (figs. 1A-B). Embora não tenha sido realizada ainda análise de imagem, os resultados sugerem fortemente maior acúmulo de corpos lipídicos nas germinações em presença de sacarose. A presença de grandes corpos lipídicos também foi observada no tubo germinativo (fig. 7D).

5.6 EFEITOS DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE KTU E SACAROSE SOBRE A GERMINAÇÃO

Nos tratamentos com sacarose e KTU observou-se, nos conídios germinados, o mesmo padrão de acúmulo de lipídeos que foi encontrado nas incubações com sacarose apenas: grandes corpos lipídicos no conídio germinado e tubo germinativo (figs. 8A-D). Contudo, devido à presença do KTU, os apressórios não estavam melanizados (fig. 8E), permitindo a visualização dos corpos lipídicos nos apressórios (fig. 8F). Devemos considerar que, como descrito anteriormente, a germinação apenas com KTU e água também revelou grandes corpos lipídicos armazenados no conídio e apressório (figs. 3C-D). Para elucidar se o efeito é somatório ou não pretendemos realizar no futuro análises quantitativas dos lipídios nas diferentes situações de incubação.

5.7 EFEITOS DA SACAROSE SOBRE A VACUOLIZAÇÃO

Pela captação de laranja de acridina foi possível analisar a morfologia dos vacúolos em células vivas, livres de artefatos de células fixadas, e confirmar o seu

pH ácido (fig. 9). No experimento com sacarose, os vacúolos do conídio e tubo germinativo aparecem maiores (fig. 9C) do que no controle (fig. 9A), contendo vesículas acídicas. Vesículas acídicas também estão presentes no tubo germinativo e apressório, e são visíveis como pequenas manchas escuras através do DIC (fig. 9D). No controle, os vacúolos no conídio e tubo germinativo são pequenos e mais numerosos (fig. 9A).

5.8 EFEITO DO KTU E SACAROSE SOBRE OS CONÍDIOS NÃO GERMINADOS

Além de interferir na mobilização de lipídeos, melanização do apressório e vacuolização durante a germinação, a sacarose e o KTU tiveram efeito sobre os conídios que não germinavam. Comparando os conídios não germinados do controle (figs. 10 A–B) com os não germinados tratados com sacarose (figs. 10C-D) e KTU (figs. 10E-F), verificamos que os conídios tratados adquiriam formato anormal, com aumento do volume celular, com exceção da região central onde localiza-se o núcleo, o que deu a impressão de um acinturamento. Nas regiões dilatadas verificou-se corpos lipídicos maiores, o que sugere que o aumento de tamanho destas regiões seja decorrente do aumento de tamanho dos corpos lipídicos. Fazendo uma analogia com animais, pode-se dizer que o conídio “engordou”.

Os resultados descritos acima são de análises de conídios germinados com 24 horas de incubação, no entanto, foram obtidos os mesmos resultados em 72 horas de incubação.

5.9 ESTUDO DA GERMINAÇÃO ATRAVÉS DE MICROFILMAGEM

Nos estudos sobre a germinação do controle foram captadas imagens de células vivas. O mesmo conídio filmado em dois planos de foco permitiu verificar com mais detalhes aspectos morfológicos das estruturas de infecção. Assim, os filmes 1 e 2 representam dois planos do mesmo conídio germinado que formou apressório, tubo germinativo e hifa primária, sem a formação de conídio secundário. Da mesma forma, os filmes 3 e 4 referem-se a um mesmo conídio germinado. Neste caso o conídio germinou desenvolvendo um conídio secundário

adicional, o qual apresenta também intensa movimentação intracelular (filme 3), e a hifa primária que já se encontra ramificada (filme 4).

Através das microfilmagens foi possível distinguir melhor as diferenças entre a vacuolização do apressório primário e apressório secundário (filmes 5 e 6). O apressório primário normalmente possuía um grande vacúolo, dentro do qual a movimentação de grânulos era facilmente visualizada (filme 6).

Nos conídios tratados apenas com KTU, observamos a presença de grandes corpos lipídicos residuais, os quais puderam ser comprovadamente descritos através dos microfilmes obtidos em microscópio confocal, com o corante Vermelho Nilo (filme 7). Neste filme, obtido a partir de conídios germinados com 24 horas de incubação, podemos visualizar os corpos lipídicos se movimentando dentro do conídio.

A movimentação dos corpos lipídicos nos conídios germinados na presença de sacarose também foi observada (filmes 8 e 9). Em alguns casos, interessante, os corpos lipídicos pareciam estar dentro do vacúolo (filme 9). Outro aspecto interessante constatado foi a movimentação das vesículas ácidas dentro dos grandes vacúolos (filme 10) na marcação com laranja de acridina. No filme 10, percebe-se que o apressório secundário contém vacúolos menores que o apressório primário. É importante lembrar que os vacúolos são estruturas tridimensionais que se estendem por todo o conídio.

5.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

O processamento sobre membranas de celofane foi inviável, pois os conídios não permaneciam aderidos à superfície após a passagem pelos fixadores. Assim a padronização foi realizada em células removidas dos fragmentos de celofane antes da fixação. Embora a ultramicrotomia e as análises ainda estejam em desenvolvimento, já se pode perceber que o processamento de rotina mostrou-se eficiente. Organelas muito lábeis, como os corpos lipídicos (fig. 11 A-B) foram preservados, dentre outros. Nos apressórios desta-se a presença de vacúolos com material muito elétron-denso (figs. 11A, B, C, F), corpos lipídicos associados a vacúolos (fig. 11B) e regiões com aglomerados de mitocôndrias (figs. 11D-E). Os conídios não germinados de seis dias de idade apresentaram-se com o citoplasma

repleto de corpos lipídicos (fig. 11G), confirmando os resultados previamente demonstrados em DIC e microscopia confocal (fig. 10 A-B). Não se observou camada definida correspondente a deposição de melanina na parede celular (figs. 11C-D). Entretanto, paredes celulares de diferentes espessuras foram visualizadas (figs. 11C-D). É possível que as paredes mais delgadas correspondam a apressórios mais jovens e que as paredes mais espessas a apressórios mais desenvolvidos. Estas paredes mais espessas (fig. 11D) apresentaram-se também menos elétrons lucentes quando comparadas as paredes mais delgadas (fig. 11C). Entretanto, tais observações ainda são preliminares. Análises futuras deverão ser realizadas para esclarecer estes resultados.

5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O processamento para MEV sem metalização mostrou-se eficiente, como pode ser observado na figura 12. Através desta metodologia, regiões celulares com maior densidade de matéria aparecem mais claras enquanto as regiões correspondentes aos vacúolos aparecem mais escuras (figs. 12A-B). Logo, além da morfologia de superfície, também foi possível visualizar as regiões de grandes vacúolos, conforme comparação com os resultados de microscopia confocal e DIC (figs. 7A-B). A visão panorâmica dos conídios germinados mostra a versatilidade e plasticidade do processo germinativo, demonstrada pela presença de tubos germinativos que se ramificam (fig. 12A), número variado de apressórios e graus de maturação (figs. 12A-B). Os septos que separam os conídios germinados, tubos germinativos e apressórios ficaram claramente visíveis (fig. 12A, inserto). Foi possível também observar a matriz extracelular associada aos apressórios (fig. 12B).

FIGURA 1 – GERMINAÇÃO DO CONTROLE COM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO. A-

B: Coluna da esquerda: conídios observados através de DIC. Coluna da direita: conídios correspondentes corados com VN. A – Observam-se apressórios melanizados (1 e *) e não melanizados (3) a partir dos quais se projetam hifas primárias penetrando no celofane (2 e 4). Nota-se um conídio secundário (seta grossa) sendo formado a partir do conídio primário (seta fina). Inseto à esquerda: ampliação do apressório melanizado 1 (seta grossa) e sua hifa primária em outro plano de foco (seta fina). Inseto à direita: hifa primária no seu plano de foco (seta grossa), e o apressório 1 fora de foco (asterisco). B – Observam-se poucos corpos lipídicos em apressórios melanizados (1 e *), e não melanizado (3). Neste plano de foco não se visualiza conteúdo corado nas regiões que correspondes às hifas de penetração (3 e 4). Inseto à esquerda: ampliação do apressório melanizado 1 (seta grossa). Inseto à direita: hifa primária 2 (seta grossa) observada no seu plano de foco com poucos corpos lipídicos.

C,D,E,F – Ampliação do apressório não melanizado 3 e dos detalhes da penetração através de DIC.

C – apressório 3 (seta). D – Poro do apressório. Inseto: processamento de imagem Adobe Photoshop (filtro Emboss) para destacar o poro (seta). E – Hifa primária (seta grossa) e outro plano de foco do poro (seta fina). F – Hifa primária em plano de foco (seta grossa) com septo (seta fina).

Barras= 5 μ m.

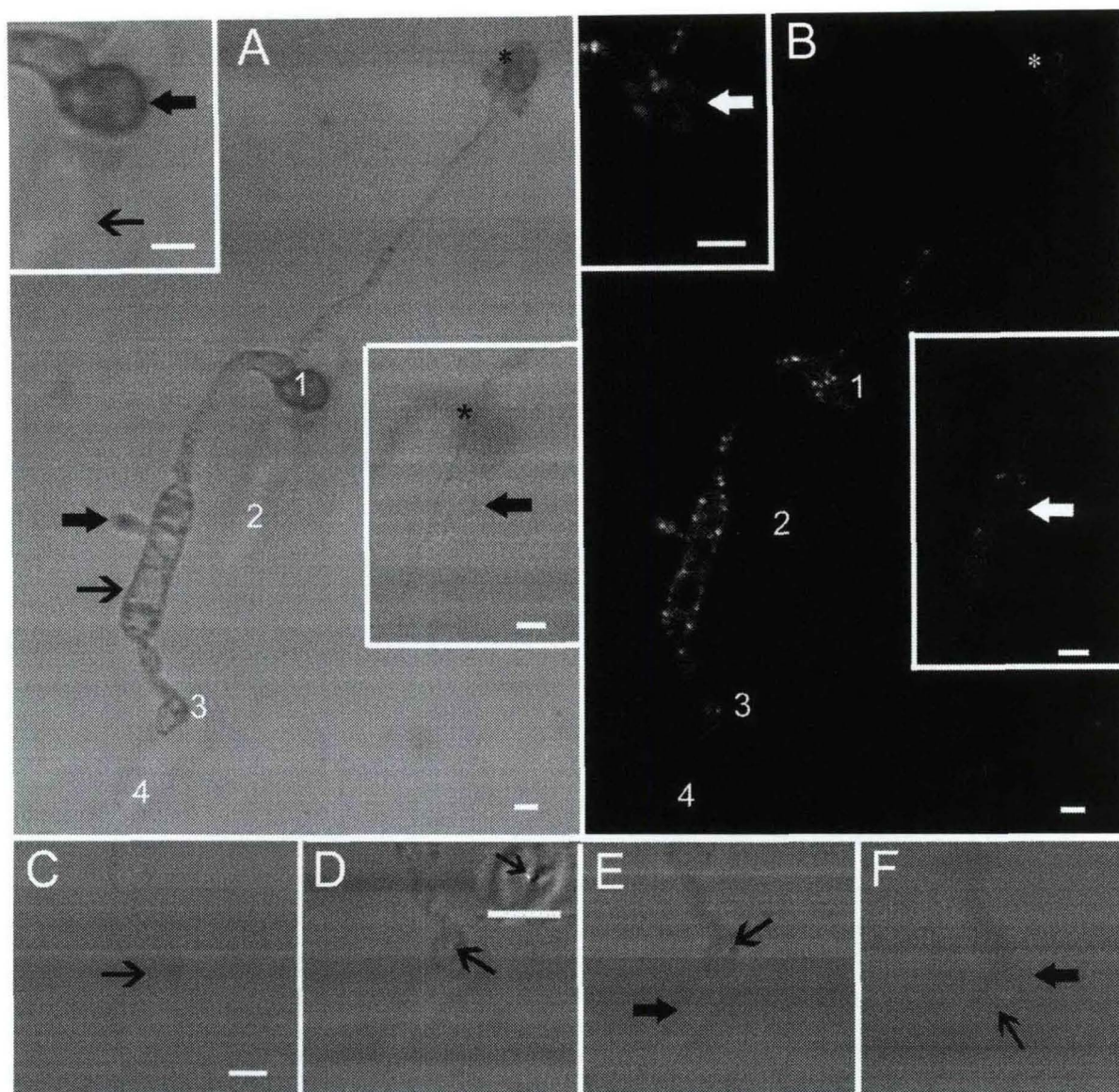


FIGURA 1 – GERMINAÇÃO DO CONTROLE COM 24 HORAS DE INCUBAÇÃO

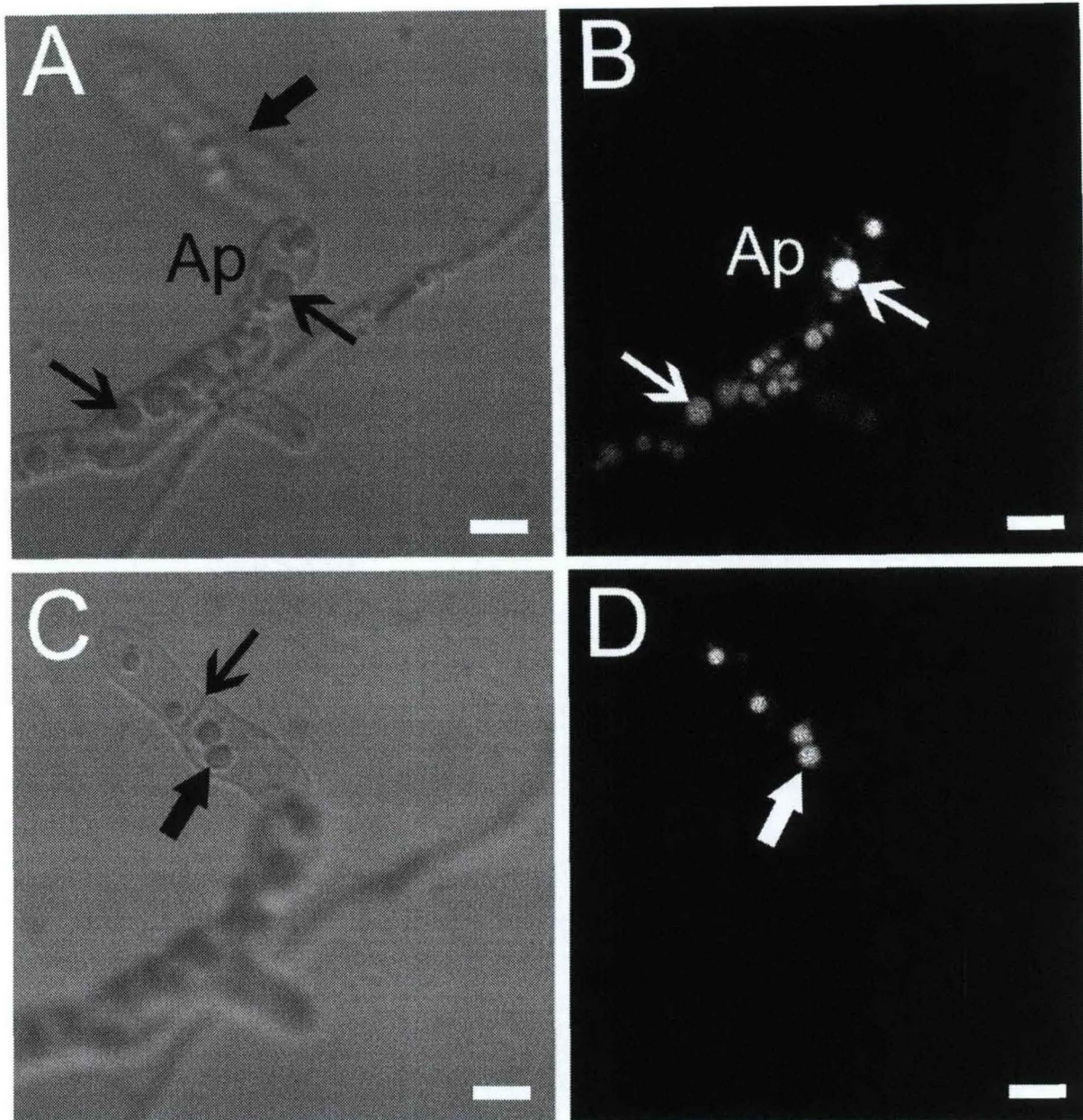


FIGURA 2 – INIBIÇÃO DA MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO COM KTU. Coluna da esquerda: imagens em DIC. Coluna da direita: refere-se às mesmas imagens da esquerda através de marcação com VN. A – Conídio germinado com um apressório não melanizado (Ap), grandes corpos lipídicos no conídio germinado e apressório (setas) e hifa primária (seta grossa). B – Corpos lipídicos (setas finas) no conídio e apressório (Ap). C – Hifa primária no seu plano de foco, com septo (seta fina) e lipídeos (seta grossa). D – Corpos lipídicos (seta) na hifa primária. Barras= 5 μ m.

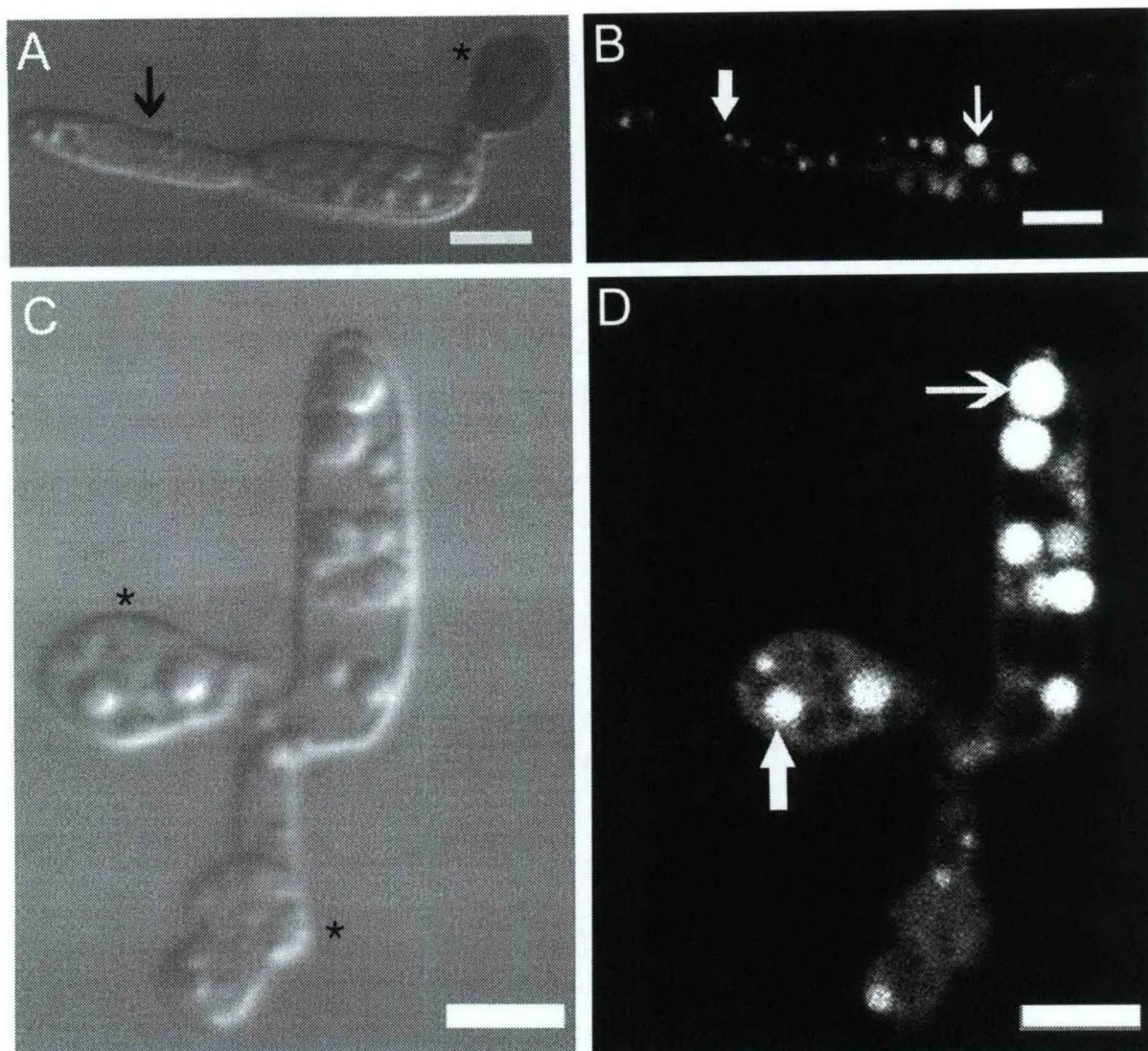


FIGURA 3 – INIBIÇÃO DA MELANIZAÇÃO SEM PENETRAÇÃO E ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA DO APRESSÓRIO APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO COM KTU. Coluna da esquerda: imagens em DIC. Coluna da direita: imagens correspondentes as da esquerda em marcação com VN. A – Controle: conídio germinado com apressório melanizado (asterisco), e conídio secundário (seta). B – Nota-se poucos corpos lipídicos no conídio primário (seta fina) e conídio secundário (seta grossa). Não se observam corpos lipídicos evidentes no apressório. C – Conídio germinado na presença de KTU após 24h de incubação em membrana de celofane: apressórios não melanizados (asteriscos), e grandes corpos lipídicos como elevações. D – Grandes corpos lipídicos no conídio (seta fina) e apressório (seta grossa). Barras= 5 μ m.

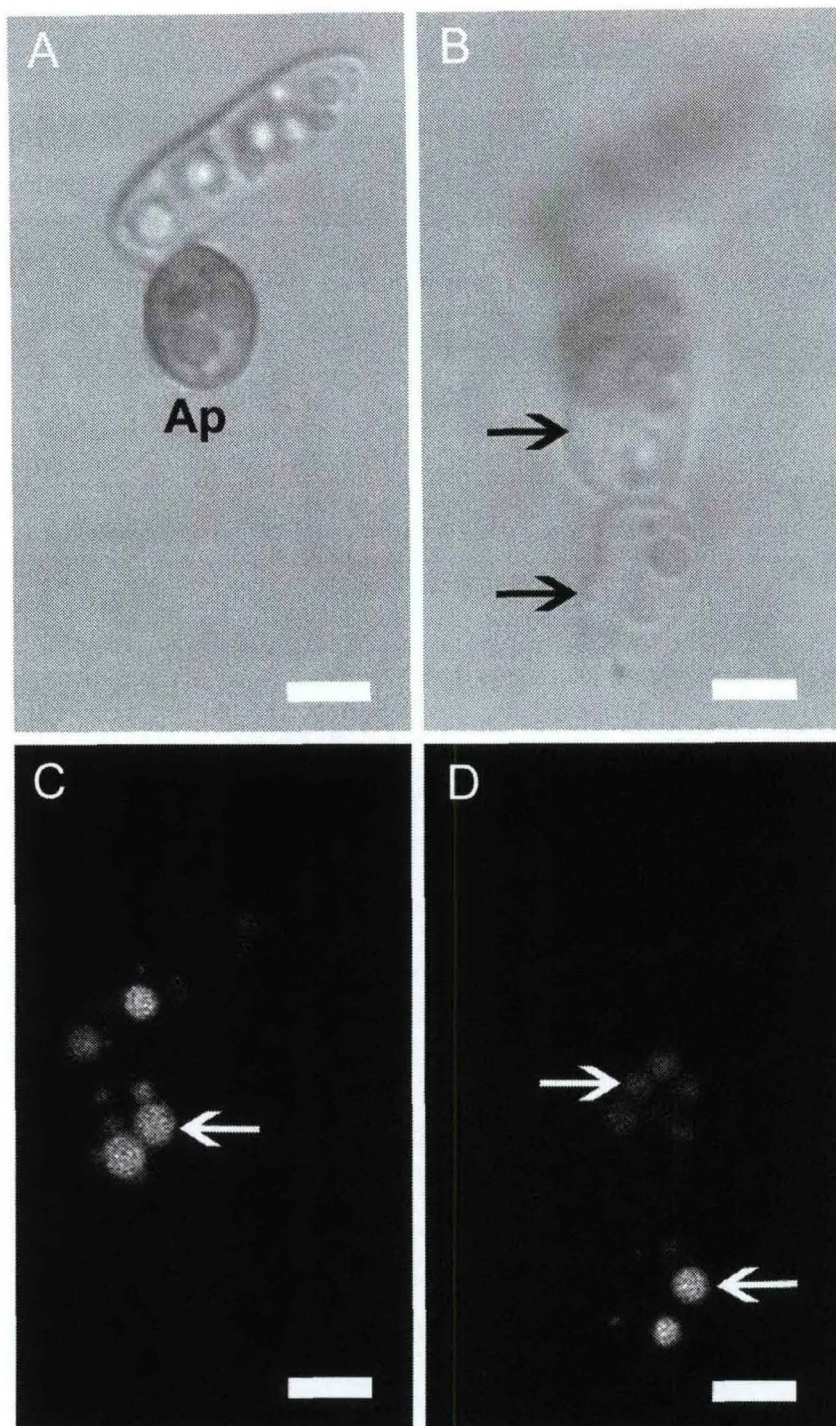


FIGURA 4 – EFEITOS DO KTU SOBRE MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO. A – Conídio germinado com apressório melanizado (Ap) e corpos lipídicos no citoplasma vistos através de DIC. B – Outro plano de foco do conídio visto em A, através de DIC, onde vemos a hifa primária (setas). C - Imagem correspondente ao conídio visto em A corado com VN. Evidenciam-se os corpos lipídicos (seta). D – Hifa primária vista em B corada com VN. Notam-se os corpos lipídicos (setas). Barras= 5 μ m.

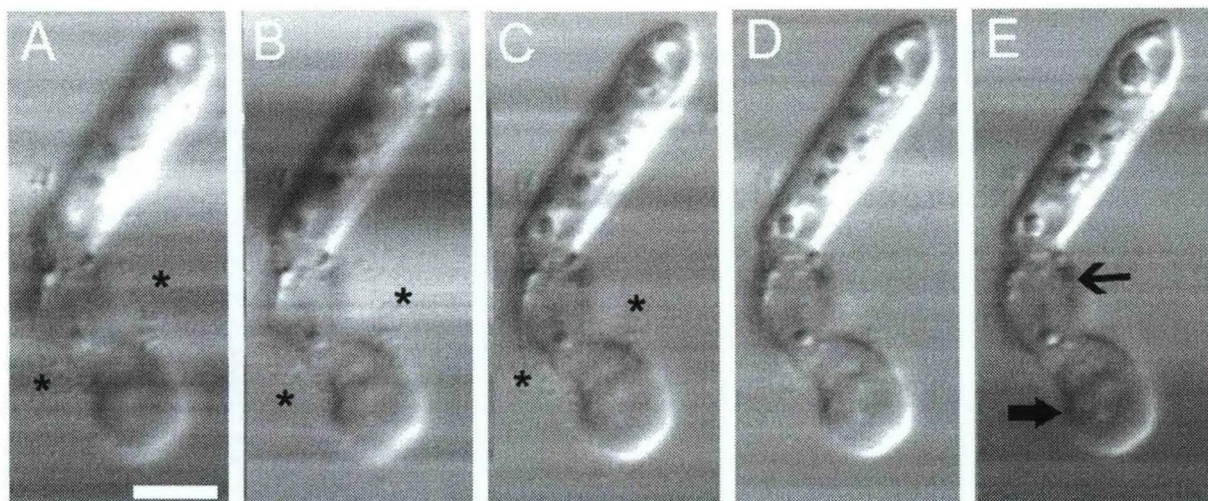


FIGURA 5 – MATRIZ EXTRACELULAR NO TRATAMENTO COM KTU. Seqüência de planos de foco, em DIC, de um conídio germinado após 24h de incubação com KTU. A, B, e C – presença de matriz extracelular em torno dos apressórios (asteriscos). D – Fatia com pouca matriz extracelular. E – Apressórios primário (seta fina) e secundário (seta grossa), ambos não melanizados. Barras= 5 μ m.

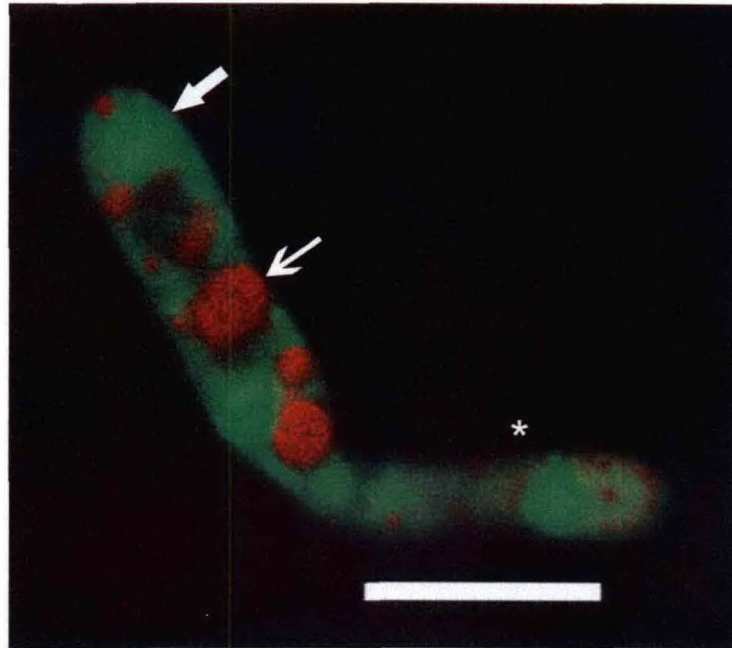


FIGURA 6 – TESTE DE VIABILIDADE DO KTU ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA. Presença de um tubo germinativo (asterisco), vacúolo retendo laranja de acridina (seta fina), e núcleo marcado em verde (seta grossa). Barra= 10 μ m.

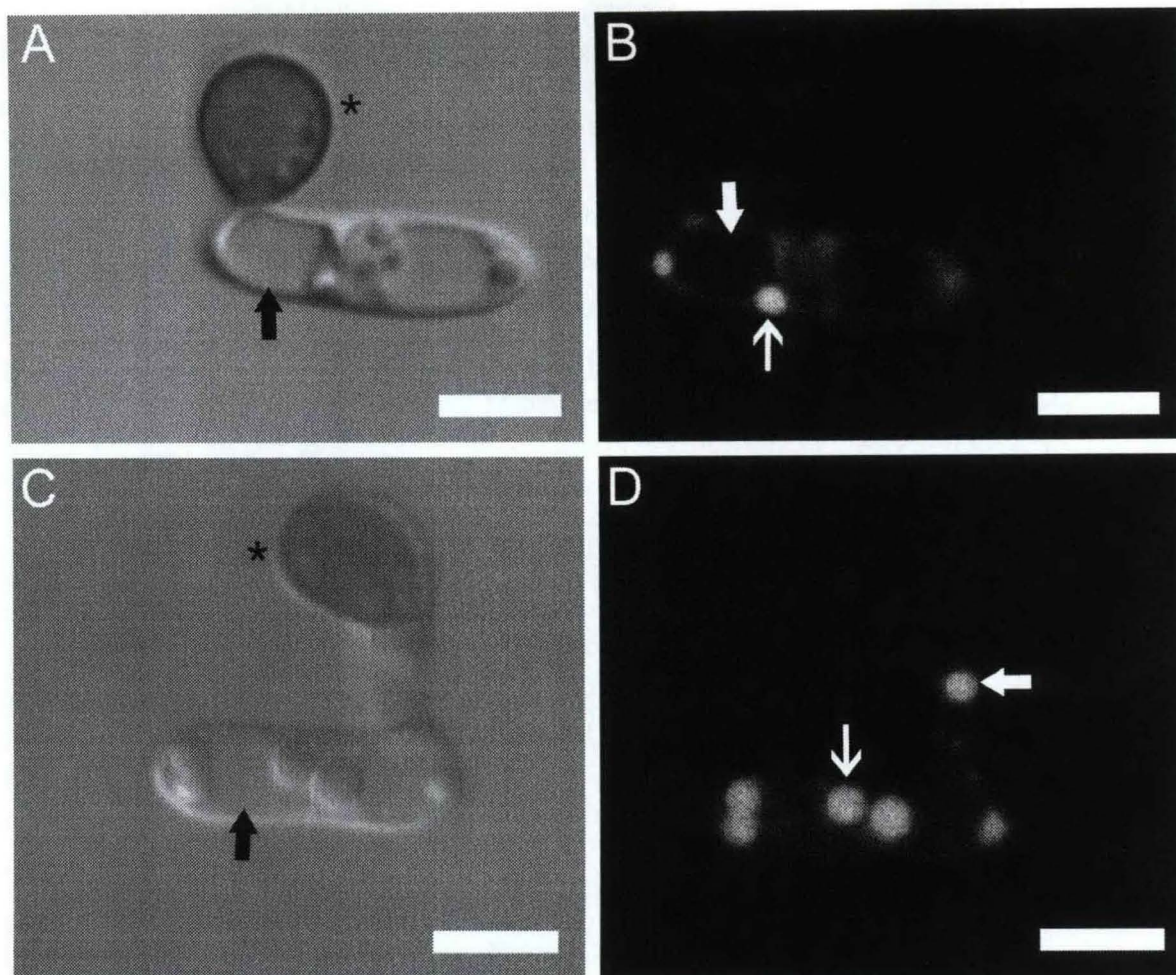


FIGURA 7 – EFEITO DA SACAROSE SOBRE A MOBILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS.

Coluna da esquerda: conídios observados em DIC. Coluna da direita: imagens correspondentes aos conídios da esquerda corados com VN. A e B: conídio controle germinado com 24h de incubação. A – Apressório melanizado (asterisco), e grande vacúolo (seta grossa). B – Vacúolo (seta grossa) e corpo lipídico (seta fina). C e D: conídio germinado após 24h de incubação na presença de sacarose. C – Apressório melanizado (asterisco) e grande vacúolo (seta). D – Grandes corpos lipídicos no conídio (seta fina) e tubo germinativo (seta grossa). Barras= 5 μ m.

FIGURA 8 – EFEITOS DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE KTU E SACAROSE SOBRE A GERMINAÇÃO. Coluna da esquerda: conídios observados através de DIC. Coluna da direita: imagens correspondentes aos conídios da esquerda corados com VN. A e B: conídio germinado após 24h de incubação com sacarose: A – Apressório melanizado (asterisco) e acúmulo de lipídeos, vistos como elevações no citoplasma e tubo germinativo; B – Corpos lipídicos (seta). C e D – Ampliação do conídio germinado visto em A. Notam-se grandes corpos lipídicos. E e F: conídio germinado, após 24h de incubação, na presença de KTU juntamente com sacarose. E – Conídio com apressórios primário e secundário (partindo do apressório primário) não melanizados (asteriscos). F – Grandes corpos lipídicos (seta fina) no citoplasma vacuolizado, e lipídeos menores nos apressórios (seta grossa). Barras= 10 μ m.

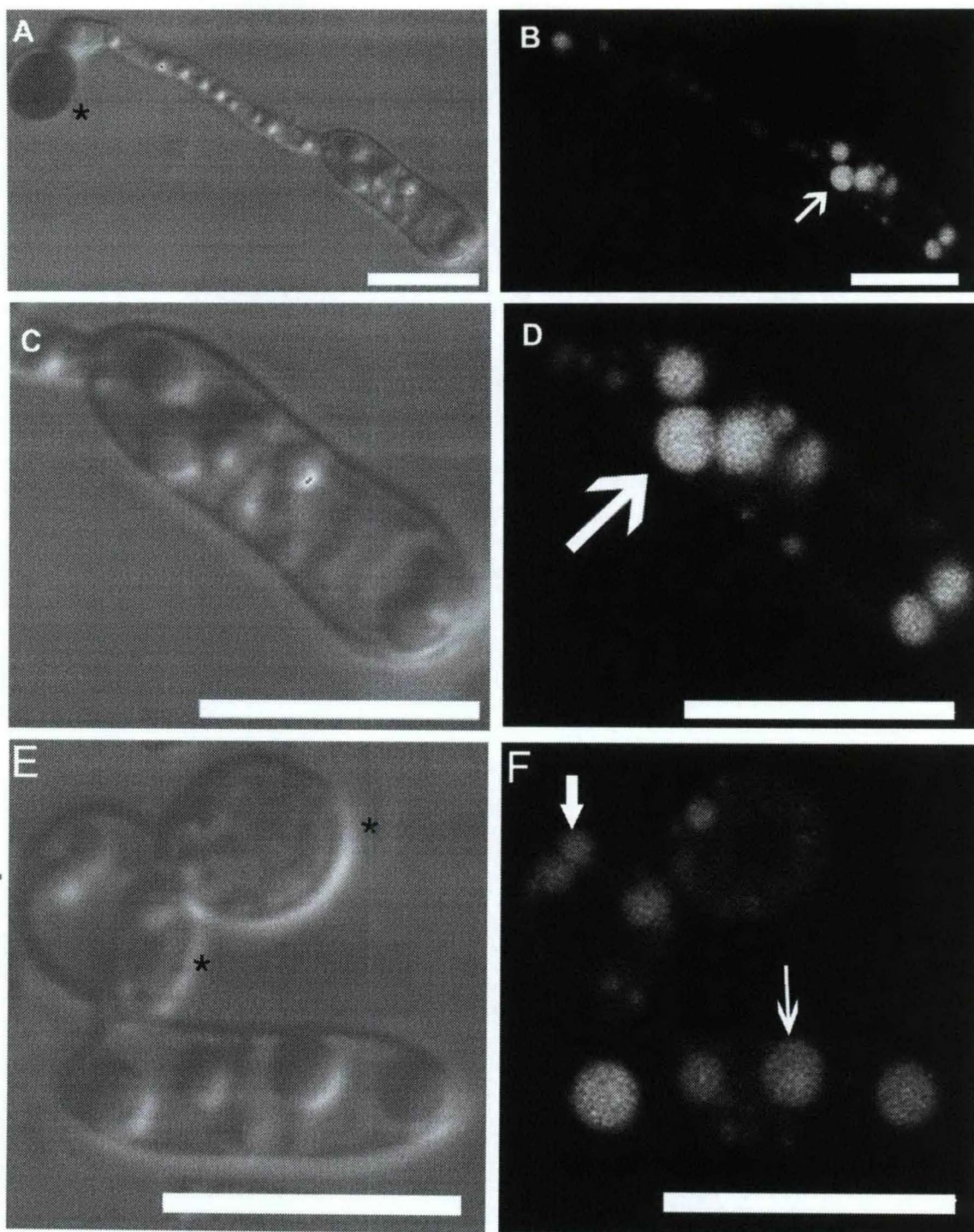


FIGURA 8 – EFEITOS DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE KTU E SACAROSE SOBRE A GERMINAÇÃO

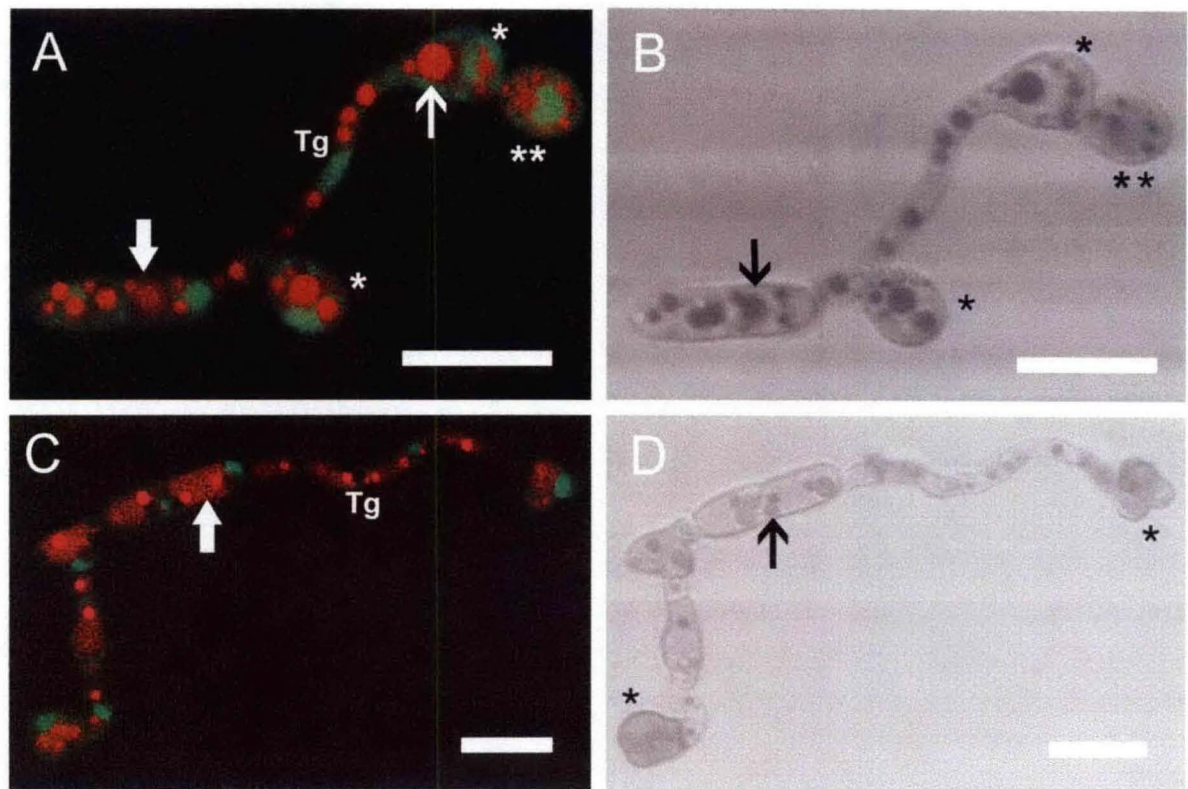


FIGURA 9 – EFEITOS DA SACAROSE SOBRE A VACUOLIZAÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO. Detecção dos vacúolos com LA em microscopia confocal. Coluna da direita: células correspondentes da esquerda através de DIC. A e B: conídio germinado controle. A - Numerosos vacúolos marcados em vermelho no conídio (seta grossa), tubo germinativo (Tg) e apressórios (seta fina). Observa-se o apressório secundário (**) com vacúolos menores que os apressórios primários (*). B - Os vacúolos aparecem como manchas escuras (seta) e os apressórios primários (*) e secundário (*) não melanizados. C e D: conídio germinado com sacarose. C - Os vacúolos aparecem maiores (seta), contendo vesículas acídicas (vermelho mais intenso). Vesículas acídicas também estão presentes no tubo germinativo (Tg). D - Dois apressórios melanizados (*), e as vesículas acídicas visíveis como pequenas manchas escuras (seta). Barras= 10 μ m.

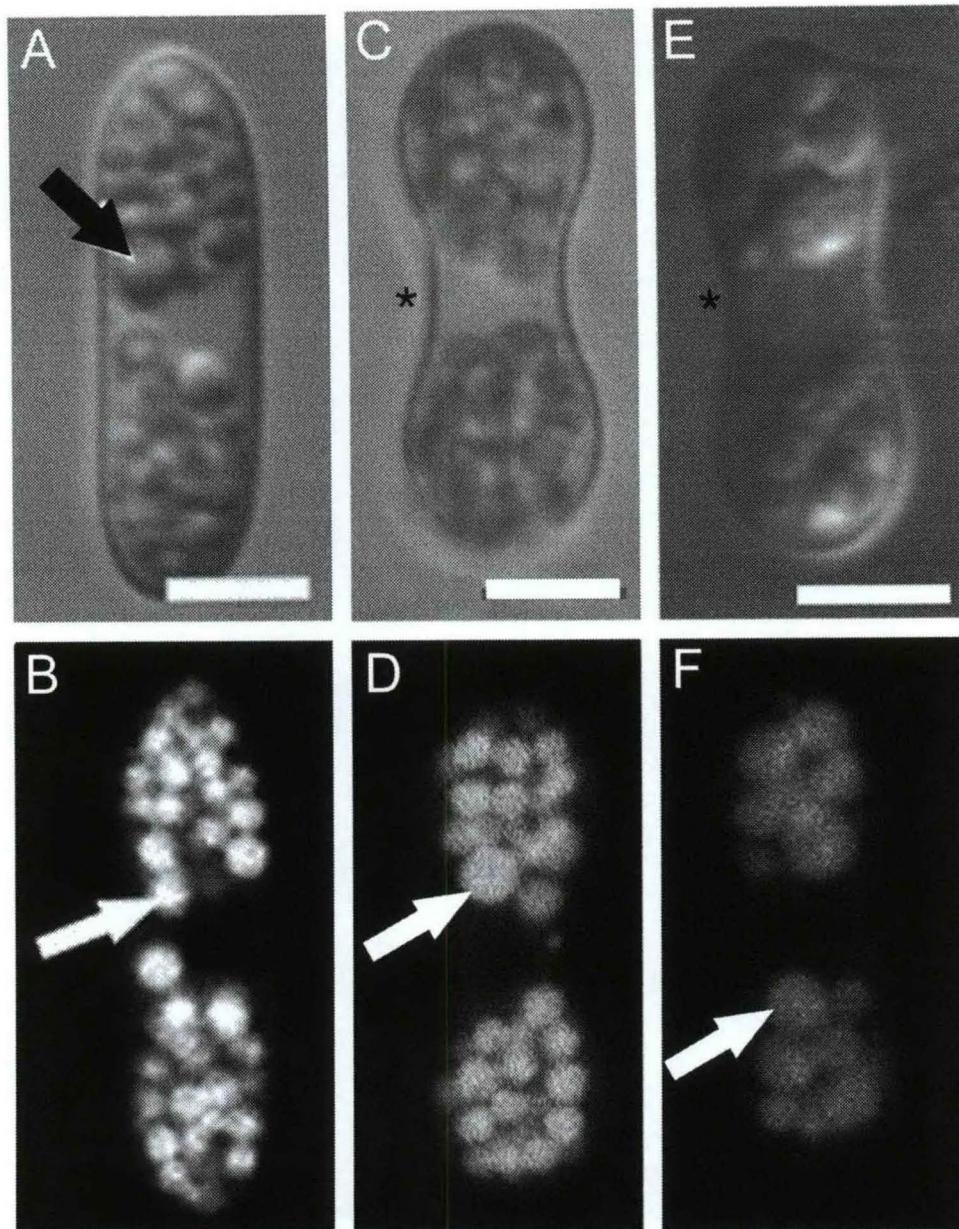


FIGURA 10 – EFEITOS DO KTU E SACAROSE SOBRE OS CONÍDIOS NÃO GERMINADOS. A coluna de cima mostra conídios não germinados observados através de DIC. A coluna de baixo mostra as imagens dos conídios, correspondentes à coluna de cima, corados com VN. A e B: conídio controle. Conídios elipsóides repletos de corpos lipídicos de tamanhos variados (setas). C e D: conídio tratado com KTU. C – Conídio com formato anormal, “acinturado” no centro (asterisco) e de maior diâmetro nas demais regiões. D – Corpos lipídicos (seta) se apresentam maiores que no controle. E e F: conídio incubado com sacarose. E – Conídio com formato incomum, com uma região “acinturada” no centro do conídio (asterisco) e demais regiões dilatadas. F – Corpos lipídicos (seta) maiores que no controle. Barras= 5 μ m.

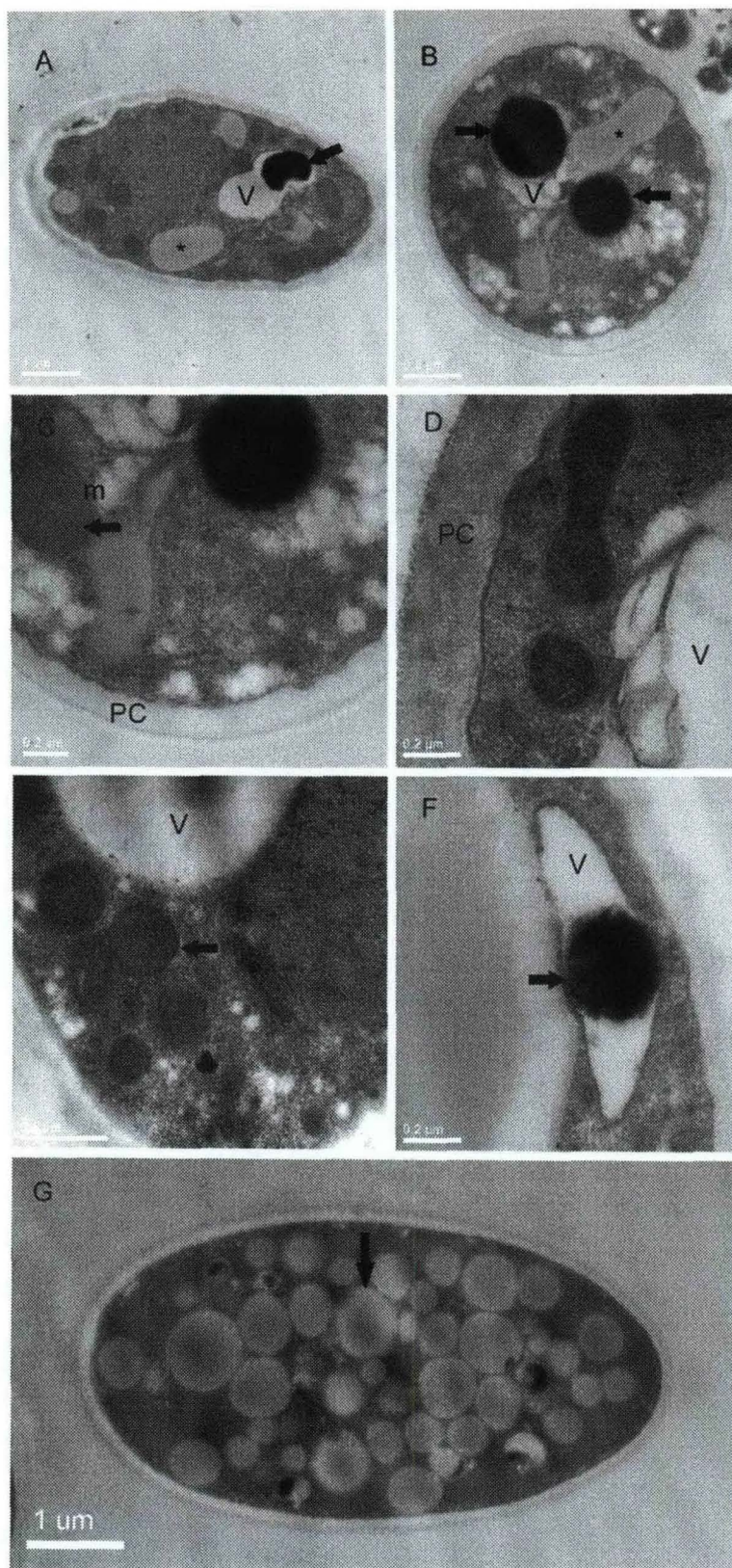


FIGURA 11 –
MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO. A-F:

Apressório. G: Conídio não germinado. A – Observa-se o corpo lipídico (asterisco) e vacúolo (v) com grânulo elétron-denso (seta). B – Grânulos elétron-densos (setas) e corpo lipídico (asterisco) justapostos ou sendo internalizados pelo vacúolo (v). C – Ampliação de região do apressório visto em B. Nota-se mitocôndria (m) com suas cristas (seta) e parede celular delgada elétron lucente (PC). D – Detalhe de parede celular mais espessa (PC). Nota-se o vacúolo (v). E – Aglomerado de mitocôndrias (seta) e vacúolo (v). F – Detalhe de um vacúolo (v) com o seu grânulo elétron-denso (seta) G – Corte longitudinal de conídio não germinado com o citoplasma repleto de corpos lipídicos (setas).

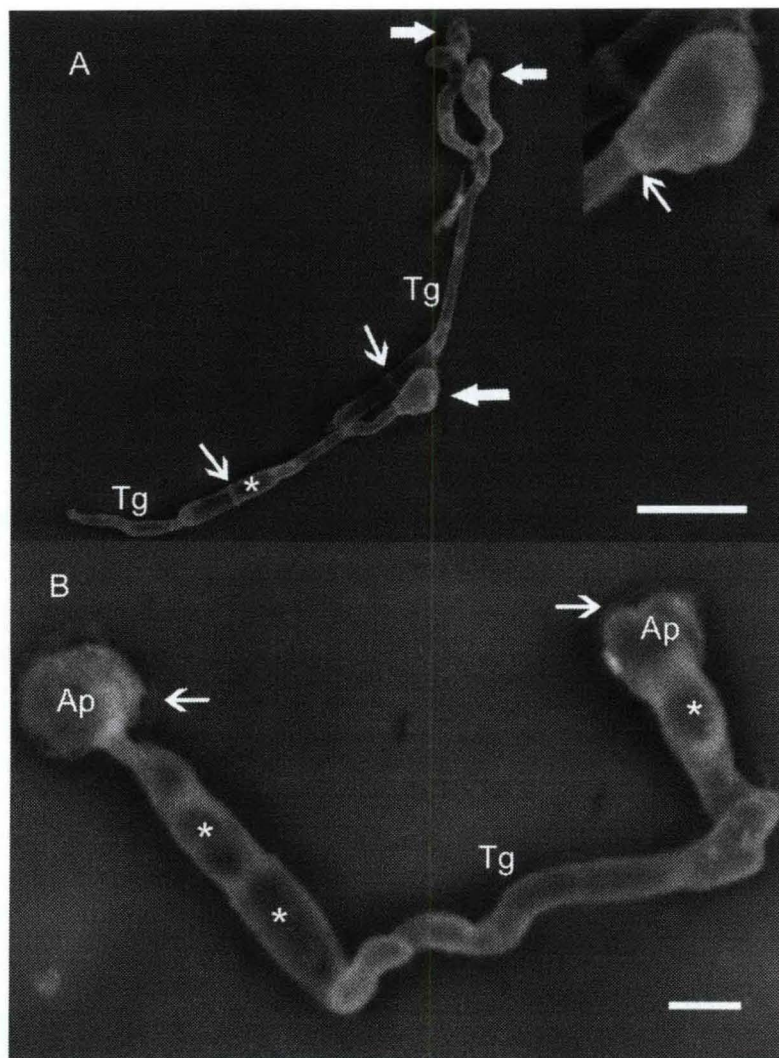


FIGURA 12 –
MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE
VARREDURA. A –
Conídios germinados nos
quais se evidenciam tubos
germinativos (Tg),
apressórios (setas grossas),
septos (setas finas) e
regiões correspondentes aos
vacúolos (asterisco). Inseto:
detalhe de um apressório.
Nota-se o septo separando o
apressório do tubo
germinativo (seta fina).
Barra= 10 μ m. B – Conídio
germinado com dois
apressórios (Ap) com matriz
extracelular evidenciada
(setas). Observam-se as
regiões correspondentes aos
vacúolos (asteriscos).
Barra= 1 μ m

LEGENDAS DOS FILMES

FILME 1 – Conídio controle germinado, com tubo germinativo e apressório melanizado, visto em DIC sem qualquer coloração.

FILME 2 – Atividade no interior da hifa primária do conídio do filme anterior, em DIC e sem coloração. O conídio germinado, tubo germinativo e apressório estão fora do foco.

FILME 3 – Movimentação de grânulos nos vacúolos e de lipídeos no conídio secundário, sem coloração, em DIC, mostrando o conídio germinado controle, com apressório melanizado.

FILME 4 – Hifa de penetração do conídio germinado visto no filme 3. Movimentos de granulações no interior da hifa primária do controle, sem coloração, em DIC, estando o conídio fora do foco.

FILME 5 – A marcação com VN, com 24 horas de incubação, mostra um apressório primário do controle, praticamente sem lipídeos, com um vacúolo (grande região central escura). Note a pequena quantidade de lipídeos contida no apressório secundário.

FILME 6 – Corresponde ao filme anterior, em DIC, evidenciando os dois apressórios ainda não melanizados. O apressório primário parte de um longo tubo germinativo, e podemos visualizar a movimentação de vesículas dentro do seu vacúolo. O apressório secundário mostra pequenas vesículas escuras.

FILME 7 – Movimentação dos corpos lipídicos em um conídio germinado na presença de KTU, com 24 horas de incubação, marcado com VN.

FILME 8 – Movimentação dos corpos lipídicos em um conídio germinado com sacarose com 24 horas de incubação, marcadas com VN.

FILME 9 – Conídio germinado do filme 8 (com 24 horas de incubação na presença de sacarose) visto através do DIC, mostrando a movimentação dos corpos lipídicos, sendo que um corpo lipídico parece estar dentro do vacúolo.

FILME 10 – Conídio germinado na presença de sacarose, marcado com LA, mostrando grandes vacúolos ácidos no conídio, tubo germinativo e apressório primário, e a movimentação de vesículas ácidas dentro dos vacúolos. Percebe-se que o apressório secundário apresenta vacúolos menores que o apressório primário.

6. DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA GERMINAÇÃO EM *C. acutatum*

A germinação de *C. acutatum* ocorreu, como descrito na literatura, na presença de água apenas (LEITE e NICHOLSON, 1992). Pudemos constatar que, nesta condição, os conídios normalmente formam tubo germinativo e apressório melanizado, e algumas vezes conídios secundários. Além disso, eles foram capazes de penetrar em membranas de celofane, o que foi comprovado pela observação das hifas primárias através de microscopia confocal e DIC. O gênero *Colletotrichum* forma apressórios melanizados, em cuja base existe um poro, de onde parte a hifa de infecção ou penetração (MENDGEN et al., 1996). Esta penetra no hospedeiro e formam-se a vesícula de infecção seguida da hifa primária (KIM et al., 2000; THINES et al., 2000). As imagens obtidas com o controle (incubação somente com água) permitiram comprovar a ocorrência do poro e da hifa primária, sendo esta caracterizada pela presença do septo (MENDGEN e DEISING, 1993). A hifa de penetração é a estrutura que primeiramente invade o hospedeiro, formada a partir de uma expansão citoplasmática muito delgada do apressório na região do poro (VAN DYKE e MIMS, 1991; MENDGEN e DEISING, 1993), a qual penetra perpendicularmente e é visualizada através de MET (VAN DYKE e MIMS, 1991; SCHADECK et al., 1998b). Como mostrado em um esquema na revisão bibliográfica (p. 4), a hifa de penetração poderia ser observada em vista lateral, o que não foi possível no nosso trabalho, uma vez que as análises se processaram sem cortes do material. A ausência da vesícula de infecção pode ser explicada pelo fato das estratégias de infecção sofrerem variação dentro do gênero *Colletotrichum* (PERFECT et al., 1999). Entretanto, análises em microscopia eletrônica de transmissão deverão ser realizadas para confirmar este resultado.

Chamou atenção a penetração em membranas de celofane a partir de apressórios não melanizados. Esse fato foi encontrado no controle e nos experimentos com KTU, sendo mais comum nestes últimos. Tal constatação vai de encontro à afirmação, amplamente estabelecida na literatura, de que a melanização do apressório é essencial para a penetração do fungo no hospedeiro

(LANGFELDER et al., 2003; MONEY e HOWARD, 1996; DEISING et al., 2000). Discutiremos esse resultado com mais detalhes adiante.

A diminuição dos lipídeos durante o processo germinativo observada no controle está de acordo com trabalhos anteriores em *C. graminicola* (SCHADECK et al., 1998a; LEITE e NICHOLSON, 1992). Análises em microscopia eletrônica de transmissão revelaram que conídios não germinados de espécies de *Colletotrichum* contêm elevado número de gotículas de lipídeos (KERRIGAN e MIMS, 1993; MIMS et al., 1995), o que foi confirmado para conídios não germinados de *C. acutatum* através de análises em microscópio confocal e MET. Dessa forma, os lipídeos armazenados nos conídios funcionam como uma reserva nutritiva, a qual é disponibilizada para a germinação.

6.2 EFEITOS DO KTU SOBRE A MELANIZAÇÃO E PENETRAÇÃO EM MEMBRANAS DE CELOFANE

Apesar da denominação de fungicida que é dada à carpropamida na literatura, ela não provoca a morte do fungo. Em tese, a carpropamida apenas inibe a síntese de melanina (JENNINGS et al., 2000). Como pudemos comprovar pela captação de laranja de acridina pelos conídios incubados com carpropamida, esta não mata o fungo. A laranja de acridina acumula-se em compartimentos ácidos (www.probes.com). O pH ácido só existe em células viáveis e é mantido pela bomba $H^+ATPase$ (MUNN e RIEZMAN, 1994). Portanto, se a célula produz ATP é porque está viável e metabolicamente ativa.

Com aproximadamente 24 horas de incubação, a carpropamida inibiu a melanização do apressório em todas as concentrações testadas. Esse fato é explicado por JENNINGS et al. (2000) como sendo resultado da ação inibitória da carpropamida sobre a scitalona desidratase. A scitalona desidratase catalisa a desidratação de scitalona e vermelona, os quais são precursores de melanina (JENNINGS et al., 2000).

Por outro lado, com cerca de 72 horas de incubação com KTU, foram encontrados apressórios melanizados e não melanizados. Nestas condições, a carpropamida adicionada no início da incubação já não mais bloqueava a

melanização. Uma explicação seria o conídio estar degradando a carpropamida, devido à síntese de mais enzimas.

Sabe-se que os fungos produzem uma série de enzimas capazes de decompor compostos orgânicos, entre elas a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, as quais são as enzimas mais envolvidas na degradação de compostos como a lignina (KUHAD et al., 1997). A lacase, de acordo com WONG e YU (1999), é produzida em situações de baixa concentração de glicose, e sua presença está descrita em vários fungos, como *Cyathus bulleri* (DHAWAN e KUHAD, 2002) e *Pleurotus sarcocaju* (TUOR et al., 1995). A lignina peroxidase também ocorre em condições de meio com carência nutricional (WONG e YU, 1999). Resultados (não mostrados) de nosso laboratório indicam que o micélio de *C. acutatum* é capaz de degradar corantes artificiais, como o azul de metileno e o azul jeans. Neste contexto, podemos supor que enzimas como a lacase por exemplo poderiam estar envolvidas na degradação do KTU em *C. acutatum*.

No que se refere à penetração *in vitro*, também foram encontrados resultados inesperados, mas que explicam a ineficiência do KTU relatada no campo para controle da antracnose do morango. Conídios germinados em membranas de celofane na presença de KTU, mesmo com apressório hialino (não melanizado), e apressórios não melanizados do controle apresentaram hifa primária no interior do celofane. Tal resultado discorda de trabalhos anteriores, os quais afirmam que para que ocorra a pressão de turgor necessária para a penetração é preciso que o apressório esteja melanizado (DEISING et al., 2000; LANGFELDER et al., 2003). A melanina diminui a permeabilidade do apressório e aumenta a resistência mecânica, o que facilita a acumulação de moléculas geradoras da pressão de turgor dentro do mesmo, como o glicerol (DEISING et al., 2000; LANGFELDER et al., 2003; THINES et al., 2000). Estudos realizados com diferentes fungos, inclusive com *C. lagenarium* (antracnose de cucurbitáceas) e *C. lindemuthianum* (antracnose do feijão), comprovam a relação entre melanina, pressão de turgor e virulência nestes fungos fitopatogênicos (DEISING et al., 2000; LANGFELDER et al., 2003).

Dentro deste contexto, os nossos resultados mostrando que em *C. acutatum* a pressão de turgor, mesmo na ausência de melanina, foi suficiente para a penetração em membranas de celofane, abrem uma nova frente de pesquisa no

que se refere à melanina e infecção. Não podemos excluir que o substrato utilizado possa estar oferecendo baixa resistência à penetração. O celofane é formado somente por celulose, diferentemente das complexas paredes celulares dos vegetais do hospedeiro. Estudos futuros incluem ensaios de penetração *in vivo*, para confirmar se os resultados obtidos *in vitro* ocorrem da mesma forma nas folhas e frutos do morangueiro. Devemos também considerar a hipótese de que a composição da parede celular do apressório pode ser modificada em situações de inibição da síntese de melanina. Por exemplo, a quitina também é indispensável para a produção da pressão de turgor em *C. graminicola* (DEISING et al., 2000).

Outra característica comumente encontrada nos conídios germinados com KTU foi a presença de matriz extracelular bem desenvolvida ao redor dos apressórios. Segundo VAN DYKE e MIMS (1991), a matriz extracelular está relacionada à adesão do apressório à superfície hospedeira. Tem se atribuído à matriz extracelular participação nas forças que atuam na penetração (BECHINGER et al., 1999). Assim, é possível que o apressório não melanizado compense a deficiência de melanina com a produção de mais matriz extracelular.

6.3 EFEITOS DA ADIÇÃO DE FONTE DE CARBONO SOBRE A MELANIZAÇÃO, MOBILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS E VACUOLIZAÇÃO

As exigências nutricionais para a germinação são muito variadas entre os fungos. Alguns necessitam obrigatoriamente de adição de nutrientes (CARLILE e WATKINSON, 1994), enquanto outros germinam somente em presença de água, como *C. graminicola* (SCHADECK et al., 1998a). Os resultados encontrados em *C. acutatum* (incubação apenas com água), que incluem o consumo dos lipídeos armazenados e aumento dos vacúolos durante a germinação, ocorreram conforme o esperado de acordo com trabalhos anteriores (LEITE e NICHOLSON, 1992; SCHADECK et al., 1998a).

Com a adição de sacarose ou dextrose aproximadamente 100% dos conídios germinavam. Menor diminuição do conteúdo lipídico no conídio germinado era perceptível a simples visualização (quando comparado ao controle), além da deposição de grandes corpos lipídicos no tubo germinativo e no apressório. Além disso, a intensidade da coloração dos apressórios, por análise visual, indicava

nitidamente maior deposição de melanina. Assim, a adição de sacarose e dextrose agiu ativando a germinação e aparentemente diminuiu o consumo de lipídeos.

Os corpos lipídicos armazenados desempenham importantes funções. Os triacilgliceróis, armazenados nos lipídeos, são hidrolisados, como demonstrado em *M. grisea*, produzindo glicerol e ácidos graxos (THINES et al., 2000). Os ácidos graxos são utilizados nas diferentes rotas bioquímicas de transformação de energia e na formação de substratos para atividades de síntese (através do ciclo do glioxilato), suprimindo grande parte das necessidades do acelerado metabolismo da germinação (WEETE, 1984). É possível que os carboidratos adicionados tenham sido utilizados em parte destas funções, acontecendo uma economia dos lipídeos armazenados. Entretanto, o processo de penetração tem sido atribuído ao outro produto da digestão dos triacilgliceróis, o glicerol, o qual se acumula no apressório e é responsável pela pressão de turgor necessária para a penetração, conforme descrito em *M. grisea* (THINES et al., 2000). Logo, a digestão intracelular dos lipídios tem sido considerada vital para o sucesso da infecção.

No conídio não germinado, condição na qual não está acontecendo o consumo acelerado de corpos lipídicos como ocorre na germinação, fica evidente que a adição de sacarose e KTU aumenta o tamanho dos corpos lipídicos. Podemos especular algumas hipóteses para a explicação destes resultados, como:

- a) Pode-se pensar que corpos lipídicos parcialmente digeridos ou não digeridos se fundiram, ou mesmo que tenham servido de matriz para adição de novos triacilgliceróis. Os substratos adicionados seriam utilizados para o metabolismo, economizando os lipídeos. Neste caso, a hidrólise dos triacilgliceróis teria acontecido em menor proporção e, portanto, menor quantidade de glicerol seria originada pela digestão dos lipídeos, a qual mesmo assim, foi suficiente para a geração da pressão de turgor, mesmo na ausência de melanina. A participação de outras moléculas na geração da pressão de turgor não é corroborada pela literatura, uma vez que os estudos indicam firmemente que o glicerol é um agente essencial na geração da pressão de turgor (THINES et al., 2000; DEISING et al., 2000).
- b) Os corpos lipídicos dos conídios foram consumidos segundo um padrão geneticamente determinado e, mesmo em presença de substratos, originaram o glicerol, uma vez que sem glicerol não há penetração (THINES et al., 2000). Nesta situação, os substratos adicionados seriam utilizados para a síntese de novos

ácidos graxos de triacilgliceróis, que se organizariam em corpos lipídicos, os quais apresentam um padrão morfológico diferente do conídio germinado na ausência de sacarose.

Enquanto nos apressórios melanizados os corpos lipídicos evidenciados pelo Vermelho Nilo eram dificilmente detectados, nos apressórios hialinos das preparações tratadas com KTU eles puderam ser perfeitamente visualizados. Estes corpos lipídicos correspondiam a gotas observadas através de DIC. Provavelmente, a melanina não permitiu a visualização dos lipídeos porque impediu a passagem dos comprimentos de onda de emissão. A proteção contra radiações é uma das funções da melanina (FRANZEN et al., 1999). Com base nestes critérios, assumiu-se que as grandes gotas observadas através de DIC no interior de apressórios melanizados eram corpos lipídicos.

O acúmulo de laranja de acridina nos vacúolos, em células vivas, além de confirmar a natureza ácida destes compartimentos, característicos do sistema endomal/lisosomal (KLIONSKY et al., 1990), fornece importantes informações sobre o comportamento destas organelas, uma vez que evita artefatos inerentes às células fixadas. Na presença de sacarose durante a germinação, constatamos a ocorrência de vacúolos maiores (contendo vesículas intravacuoles mais acídicas) e menos numerosos quando comparados ao controle. Apesar desta indução da vacuolização não ter sido ainda descrita para fungos, trabalhos revelam a indução da vacuolização em fibroblastos humanos expostos a altas concentrações de sacarose por 24 horas (HELIP-WOOLEY e THOENE, 2004). Os autores explicam essa alteração pelo fato da sacarose ser acumulada no sistema endosoma-lisosoma em células de mamíferos, e como consequência haveria a formação de grandes vacúolos mais ativos osmoticamente.

Considerando que, nas nossas condições de ensaio, mais e maiores corpos lipídicos foram observados na presença da sacarose, podemos deduzir que esta foi digerida e os monossacarídeos resultantes transportados para o citoplasma e utilizados. Vacúolos de fungos apresentam inúmeras enzimas hidrolíticas, sendo considerados organelas equivalentes aos lisosomas de células animais (KLIONSKY et al., 1990). Por outro lado, não podemos excluir que, pelo menos parte dos dissacarídeos tenha sido digerida por enzimas extracelulares, uma vez que fungos secretam inúmeras hidrolases (HERBERT et al., 2004). Neste caso, os

monossacarídeos absorvidos seriam utilizados pelo fungo para as diferentes rotas metabólicas.

6.4 PADRONIZAÇÃO PARA MET E MEV

Os procedimentos empregados para o processamento em microscopia eletrônica, tanto de transmissão quanto de varredura, mostraram-se eficientes. A presença de corpos lipídicos no apressório e no conídio não germinado confirma os resultados obtidos através de microscopia confocal. Além disso, a preservação destas estruturas indica que a fixação foi adequada, uma vez que são organelas muito lábeis e difíceis de serem conservadas (MURPHY, 2001). Este resultado adquire grande importância, visto que a microscopia eletrônica através da fixação química em fungos tem sido considerada ineficiente, dando-se preferência para técnicas que envolvem crio-fixação (MIMS, 1991). No entanto, através destas metodologias os lipídeos são totalmente extraídos, fato que inviabiliza em estudos que enfocam corpos lipídicos. No apressório destacou-se a proeminente e abundante presença de vacúolos e vesículas com material elétron-denso, fenômeno anteriormente observado em apressório de *C. graminicola* sobre folhas de milho e aveia (POLITIS e WHEELER, 1973; POLITIS, 1976) e em membranas de celofane (SCHADECK et al., 1998a). Em outras espécies de fungos também têm sido observados diferentes graus de vacuolização no apressório. Em *P. arachidis*, à medida que a infecção evolui, o apressório torna-se cada vez mais vacuolizado (MIMS et al., 1989). Da mesma forma, observou-se formação de vacúolos no apressório de *M. grisea* germinado sobre membrana de celofane (BOURETT e HOWARD, 1990). Esperávamos que o apressório apresentasse uma camada de melanina bem definida e elétron-densa, como observado em outros fungos (BOURETT e HOWARD, 1990; HOWARD e FERRARI, 1989; O'CONNELL et al., 1985; SCHADECK et al., 1998b; VAN DYKE e MIMS, 1991). Entretanto, tal camada não foi encontrada em nossas observações. É possível que todos os apressórios observados ainda estejam em um estágio hialino, embora ao microscópio óptico o material processado apresentasse muitos apressórios melanizados. Outros blocos deverão ser submetidos à ultramicrotomia e analisados posteriormente.

Os resultados obtidos através de MEV confirmam os resultados obtidos através de DIC e microscopia confocal quanto à morfologia geral do conídio germinado. Normalmente células fixadas são metalizadas para observação em MEV (MIMS, 1991). A não metalização abre uma nova perspectiva metodológica, com algumas vantagens. É mais barata, pois a metalização é realizada com ouro. Além dos detalhes de superfícies, podemos observar as regiões correspondentes aos vacúolos. Neste caso, pode-se realizar micro análise de raio X, no equipamento disponível no Centro de Microscopia Eletrônica - UFPR, para pesquisar compostos acumulados em vacúolos, abordagem muito útil nas investigações que pretendemos realizar no futuro.

7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos conclui-se que:

1. A carpropamida possui atividade inibitória da melanização do apressório em curtos períodos de incubação, contudo, após um tempo maior de incubação já não ocorre mais o bloqueio da melanização em *C. acutatum*;
2. Em *C. acutatum*, está ocorrendo a penetração em membranas de celofane a partir de apressórios não melanizados, da mesma forma que ocorre nos apressórios melanizados, com a formação de hifas primárias, tanto no controle quanto nos tratamentos com KTU;
3. O KTU promove acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma dos conídios germinados e a formação de apressórios com forma incomum;
4. A adição de dissacarídeos como a sacarose e a dextrose estimula a germinação e melanização, e também causa acúmulo de grandes corpos lipídicos nos conídios germinados;
5. Conídios incubados com sacarose ou dextrose aparentemente apresentam vacúolos maiores quando comparados ao controle;
6. O processamento padronizado para MET e MEV mostrou-se adequado para a preservação ultraestrutural.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4^a ed., 1996.
- BARBOSA, A. C.; SCHADECK, R. J. G.; SILVA, A. L. C. Vacuoles characterization of *Colletotrichum acutatum* germinated conidia by Acid Phosphatase detection. Anais do XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular, Campinas – SP, 2004.
- BARBOSA, A. C. **Caracterização do sistema vacuolar e efeitos de nutrientes durante a germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum***. Relatório de Iniciação Científica-Universidade Federal do Paraná, Orientadora: Ruth J. G. Schadeck, 19p., 2004.
- BECHINGER, C; GIEBEL, K. F.; SCHNELL, M; LEIDERER, P; DEISING H. B.; BASTMEYER, M. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of plant pathogenic fungi. **Science** 285, p. 1896-1899, 1999.
- BOJOVIC-CVETIC, D.; VUJICIC, R. Acid phosphatase and distribution in *Aspergillus flavus*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 79, p. 137-141, 1982.
- BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Can. J. Bot.**, v. 68, 329-342, 1990.
- BRAUN, E. J.; HOWARD, R. J. Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. **Protoplasma** 181, p. 202-212, 1994.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S.C. **The Fungi**. Academic Press, London, 1994.
- CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. Genetic analysis of melanin-deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 3, p. 135-143, 1990.
- DARA S.; SEMTNER, P. J. Influence of substrate type and temperature on the developmental morphology of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales), a pathogen of the tobacco aphid (Homoptera: Aphididae). **Journal Invertebr. Pathol.** 72, p. 222-228, 1998.
- DEISING, H. B.; WERNER, S; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1631-1641, 2000.
- DHAWAN, S.; KUHAD, R. C. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. **Bioresour. Technol.**, v. 84, n. 1, 2002.
- DIXON, D. M.; SZANISZLO, P. J.; POLAK, A. Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and its relationship with virulence in the early stages of

phaeohyphomycosis. In **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**, Plenum, New York, p. 297-318, 1991.

FRANZEN, A. J.; SOUZA, W.; FARINA, M.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 173, p. 395-402, 1999.

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Anemone (*Anemone coronaria* L.) **App. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 5267-5272, 2000.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**, John Wiley; Sons, Inc., Publication, p. 76-80, 375-378. 1994.

HÄNSSLER, G. D. P.; MAXWELL.; MAXWELL M. D., Demonstration of acid phosphatase-containing vacuoles in hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. **J. Bacteriol.**, v. 124, p. 997-1006, 1975.

HELIP-WOOLEY, A.; THOENE, J. G. Sucrose-induced vacuolation results in increased expression of cholesterol biosynthesis and lysosomal genes. **Exp. Cell Res.**, v. 292, p. 89-100, 2004.

HERBERT, C.; O'CONNELL, R.; GAULIN, E.; SALESSES, V.; TUGAYE, M-T-E; DUMAS, B. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, n. 2, p. 140-147, 2004.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. Role of melanin in appressorium function. **Exp. Mycol.**, v. 13, p. 403-418, 1989.

JACOBSON, E. S. Pathogenic Roles for Fungal Melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 708-717, 2000.

JENNINGS, L. D.; RAYNER, D. R.; JORDAN, D. B.; OKONYA, J. F.; BASARAB, G. S.; AMOROSE, D. K.; ANACLERIO, B. M.; LEE, J. K.; SCHWARTZ, R. S.; WHITMORE, K. A. Cyclobutane Carboxamide Inhibitors of Fungal Melanin: Biosynthesis and their Evaluation as Fungicides. **Bioorg. Med. Chem.** 8, p. 897-907, 2000.

KERRIGAN, J.; MIMS, C. W. Ultrastructural cytochemical investigations of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of pecan anthracnose. **The BEAM Newsletter of the Southeastern Electron Microscopy Society**, v. 9, p. 21-25, 1993.

KIM, J. C.; MIN, J. Y.; KIM, H. T.; KIM, B. S.; KIM, Y. S.; KIM, B. T.; YU, S. H.; YAMAGUCHI, I.; CHO, K. Y. Target site of a new antifungal compound KC10017 in the melanin Biosynthesis of *Magnaporthe grisea*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 62, p. 102-112, 1998.

KIM, Y.; KAWANO, T.; LI, D.; KOLLATUKUDY, P. E. A mitogen-activated protein kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1331-1343, 2000.

KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A.; M. Manual de Fitopatologia. **Editora Agronômica Ceres Ltda**, São Paulo, SP. 1997.

KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P.K.; EMR, S. D. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 266-292, 1990.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, p. 1717-1726, 2000.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I. Prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. **The Fungal Spore Disease Initiation in Plants and Animals**, Ed: Cole, G. T. and Hoch, H. Plenum Press, New York and London, p. 205-218, 1991.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 57, p. 47-125, 1997.

KURAHASHI, Y.; SAKAWA, S.; KINBARA, T.; TANAKA, K.; KAGABU, S. Biological activity of carpropamid (KTU3616): A new fungicide for rice blast disease. **J. Pestic. Sci.** 22, 108, 1997.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGEA, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LEANDRO, L-F-S; GLEASON, M. L.; NUTTER, F. W.; WEGULO, S. N.; DIXON P. M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology** 92, p. 659-664, 2001.

LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Mycosporine-alanine, a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Exp. Mycol.**, v. 16, p. 76-86, 1992.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, n. 9, p. 409-414, 1961.

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures on fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. Transley Review n. 48, **New Phytol.**, v. 124, p. 193-213, 1993.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** 34, p. 367-386, 1996.

MIMS, C. W. Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycologia**, v. 83, p. 1-19, 1991.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; CLAY, R. P.; NICHOLSON, R. L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. **Int. J. Plant. Sci.**, v. 156, p. 9-18, 1995.

MIMS, C. W.; TAYLOR, J.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of the early stages of infection of peanut leaves by the rust fungus *Puccinia arachidis*. **Can. J. Bot.**, v. 67, p. 3570-3579, 1989.

MONEY, N. P.; HOWARD, R. J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. **Fungal Genet. Biol.**, v. 20, p. 217-227, 1996.

MUNN, A. L.; RIEZMAN, H. Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. **J. Cell Biol.** 127, p. 373-386, 1994.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progr. Lipid Res.** 40, p. 325-348, 2001.

NICHOLSON, R. L.; HIPSKIND, J.; HANAU, R. M. Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 35, p. 243-252, 1989.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 27, p. 75-98, 1985.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. **Genetics** 155, p. 647-656, 2000.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 199, n. 2, p. 153-160, 2001.

PERFECT, S.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genet. Biol.** 27, p. 186-198, 1999.

POLITIS, D. J. Ultrastructure of penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 8, p. 117-122, 1976.

POLITIS, D. J.; WHEELER, H. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 3, p. 465-471, 1973.

- REHNSTROM, A. L.; FREE, S. J. The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 49, p. 321-330, 1997.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, New York, n. 17, p. 208-212, 1963.
- RILEY, P. A. Melanin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, n. 29, p. 1235-1239, 1997.
- RUCH, D. G.; BURTON, K. W.; INGRAM, L. An occurrence of the glyoxylate cycle in basidiospores of homobasidiomycetes. **Mycologia**, v. 83, p. 821-825, 1991.
- RUCH, D. G.; MOTTA, J. J. Ultrastructure and cytochemistry of dormant basidiospores of *Psilocybe cubensis*. **Mycologia**, v. 79, p. 387-398, 1987.
- SAITO, M. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytol.**, v. 129, p. 425-431, 1995.
- SATTLER, T.; MEYER, A. Cell free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation. **J. Cell Biol.**, v. 151, p.529-5348, 2000.
- SCHADECK, R. J. G.; LEITE, B. BUCHI; D. F. Lipid mobilization and acid phosphatase activity in lytic compartments during conidium dormancy and appressorium formation. **Cell. Struct. Funct.**, v. 23 p. 333-340, 1998a.
- SCHADECK, R. J. G.; BUCHI, D. F.; LEITE, B. Ultrastructural aspects of *Colletotrichum graminicola* conidium germination, appressorium formation and penetration on cellophane membranes: focus on lipid reserves. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** , v. 30, p. 555-561, 1998b.
- SCHADECK, R. J. G. Aspectos ultraestruturais da germinação, localização da atividade da fosfatase ácida e avaliação estrutural da fração micosporina em conídios de *Colletotrichum graminicola*. Universidade Federal do Paraná. **Tese de Doutorado**, 1999.
- SCHADECK. R. J. G.; RANDI, M. A. F.; BUCHI, D. F.; LEITE, B. Vacuolar system of ungerminated *Colletotrichum graminicola* conidia: convergence of autophagic and endocytic pathways. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 1078, p. 1-7, 2003.
- SCHADECK, R. J. G.; DO CARMO, A. E.; BARBOSA, A. C.; GRAF, L.; TOMÁZ, R.; DE SOUZA, C. F.; MENDES, J.; RANDI, M. A. F.; BUCHI, D. Morphology, lipid body and vacuole dynamics during secondary conidia formation in *Colletotrichum acutatum*: laser scanning confocal analysis. **Submitet to Can. J. Microbiol.**, 2005.
- SCHMIT, J. C.; BRODY, S. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. **Bacteriol. Rev.** 40, p. 1-41, 1976.

SELA-BUURLAGE, M.B.; EPSTEIN, L.; RODRIGUEZ, R. J. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 39, p. 345-352, 1991.

SUGUI, J. A.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Partial characterization of the extracellular matrix release onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germlings of *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 52, p. 411-425, 1998.

SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; ISHIDA, N.; YAMAMOTO, M. Chemical dissolution of cellulose membranes as a prerequisite for penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 128, p. 1035-1039, 1982.

THINES, E.; WEBER, R. W. S.; TALBOT, N. J. MAP kinase and protein kinase A – Dependent mobilization during of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnapotha grisea*. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1703-1718, 2000.

TSUJI, G.; TAKEDA, T.; FURUSAWA, I.; HORINO, O.; KUBO, Y. Carpropamida, an anti-rice blast fungicide, inhibits scytalone dehydratase activity and appressorial penetration in *Colletotrichum lagenarium*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 57, p. 211-219, 1997.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **J. Biotechnol.**, v. 41, n. 1, p.1-17, 1995.

VAN DYKE C. G.; MIMS C. W. Ultrastructure of conidia, conidium germination, and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 2455-2467, 1991.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; KOCSUBÉ, S.; FARKAS, B.; PÁL, K. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. **Res. Microbiol.**, v. 154, n. 8, p. 593-600, 2003.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.**, v. 63 (8), p. 3131-3136, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.** 62, 3004-3007, 1994.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology** 4, p. 475-478, 1958.

WEETE, J. D. Spore lipid surface wax composition; metabolism during germination In: **Infection process of fungi**. Editors: Roberts, D. W. and Aist, J. R. A Bellagio Conference, March 21-25, 1983. The Rockefeller Foundation. 1984.

WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Curr. Top. Med. Mycol.** 2, p. 338-387, 1988.

WINDER, A.; KOBAYASHI, T.; TSUKAMOTO, K.; URABE, K.; AROCA, P.; KAMEYAMA, K.; HEARING, V. J. The tyrosinase gene family-interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis. **Cell Mol. Biol. Res.** 40, p. 613-623, 1994.

WILSON, C. L.; JUNPER, G.; MASON, D. L. Vacuole dynamics in fungal pathogens. **Phytopathology**, v. 70, p. 783-788, 1980.

WONG, Y.; YU, J. Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Wat. Res.**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.